



Universidad del Papaloapan

Terra uberrima, mens aperta

Bou Lo-tama, chí jí jú

Campus Tuxtepec

División de estudios de posgrado

“Producción de bio-hidrógeno por *Escherichia coli* utilizando malanga taro (*Colocasia esculenta*) tratada con mecanólisis”

Tesis para obtener el grado de:
Maestra en Ciencias Químicas

Presentada por:
Rosa Mariela Velázquez Vargas

Director:
Dr. Erick Adrián Juárez
Arellano

Co-director:
Dr. Adolfo López Torres

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, 2024



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2024/179
ASUNTO	Jurado para examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 26 de agosto de 2024

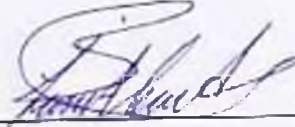
ROSA MARIELA VELÁZQUEZ VARGAS
MAESTRIA EN CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de **Maestra en Ciencias Químicas** estará integrado por los siguientes investigadores.

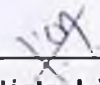
Profesor Investigador	Jurado de Examen
Dr. Mario Valera Zaragoza	Presidente
Dr. Omar Viñas Bravo	Secretario
Dr. Adolfo López Torres	Vocal
Dr. Miguel Ángel García Muñoz	Primer Suplente
Dra. Ana Karín Navarro Martínez	Segundo Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente
terra ubornna, mens aperta
Beu Lo-lama, chí | | jú


Dr. José Abad Zavaleta
Jefe de la división de estudios de posgrado.




M. en C. Héctor López Arjona
Vicerrector Académico
Vo. Bo.



C c p Dr. Erick Adrián Juárez Arellano - Director de tesis.
C c p Dra. Karla Viridiana Castro Cerritos - Coordinadora de la Maestría en Ciencias Químicas.
C c p M. E. Yesenia Barrientos Arenal - Jefa del Departamento de Servicios Escolares.
C c p Archivo.

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 68301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril 575, Ciudad Universitaria
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8725230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2024/178
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 26 de agosto de 2024

M. EN C. HÉCTOR LÓPEZ ARJONA
VICE-RECTOR ACADÉMICO
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que, el jurado evaluador del examen para obtener el grado de **Maestra en Ciencias Químicas** de la **C. Rosa Marlela Velázquez Vargas**, con número de **Matrícula 21130007**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título **"Producción de bio-hidrógeno por *Escherichia coli* utilizando malanga taro (*Colocasia esculenta*) tratada con mecanólisis"**, para su posterior presentación y defensa por la sustentante.

Agradezco su atención y quedo a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.

Atentamente
terra uberrima, mens aperta
Beu Lo-tama, chi Ji ju

Dr. José Abad Zavaleta
Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. Dr. Erick Adrián Juárez Arellano – Director de tesis
C.c.p. Dra. Karla Viridiana Castro Cerritos – Coordinadora de la Maestría en Ciencias Químicas
C.c.p. M. E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa del Departamento de Servicios Escolares
C.c.p. Archivo.

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circunferencial No. 200, Col. Parque Industrial
C.P. 36301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

Agradecimientos

A mis padres: **Andrés Velázquez Pérez** e **Ignacia Vargas Revilla**, porque sin su apoyo, amor y consejos no lograría ni sería lo que soy hoy. A mis hermanos y hermanas: **Francisco, Estefana, Cristóbal, Edith, Elizabeth, Pablo, Andrés, Ezequiel** y **Santiago**, por apoyarme en cada etapa de mi vida y en cada una de mis metas. Gracias familia por estar ahí siempre, les estoy eternamente agradecida.

A mi estimado **Cristóbal** y a su familia, **Jacinto Miguel**, por apoyarme y darme ánimos siempre en los buenos y malos momentos. Muchas gracias Cris por permanecer a mi lado y ser paciente conmigo en todo momento, y permitirme ser parte de esta maravillosa familia.

A mi asesor de tesis el Dr. **Erick Adrián Juárez Arellano** por aceptarme en su grupo de trabajo y hacerme participe de este proyecto, por sus enseñanzas, sus consejos, sus ánimos, su tiempo y paciencia para concluir este trabajo, y por apoyarme con los trámites para mi titulación. A mi Co- director de tesis el Dr. **Adolfo López Torres** por sus consejos y los ánimos para mejorar aún más, por compartirme sus conocimientos y su paciencia para enseñarme a utilizar los equipos, y por su tiempo para revisar este trabajo. A la Dra. **A. Karin Navarro Martínez** por apoyarme durante el proceso de este trabajo, por sus enseñanzas y su tiempo para revisar este trabajo. Al Dr. **Alfredo Martínez García** por brindarme su apoyo, sus conocimientos, y su tiempo para iniciar este proyecto.

Al Dr. **Mario Valera Zaragoza**, Dr. **Omar Viñas Bravo** y el Dr. **Miguel Ángel García Muñoz** por sus correcciones, sugerencias, su apoyo y tiempo para poder culminar este trabajo.

Al Dr. **José Abad Zavaleta** y a la Dra. **Karla Viridiana Castro Cerritos** que me apoyaron durante la carrera y el proceso para mi titulación.
Por esto y más muchas gracias a todos.

A mis compañeros de la universidad: **Tere, Edgar, Lidia** y **Flavio** por su amistad y su apoyo tanto en lo académico como en lo personal.

A todos mis profesores de la Licenciatura y la Maestría en Ciencias Químicas, que me compartieron sus conocimientos y experiencias para mi desarrollo profesional en cada una mis clases y que me animaron siempre a mejorar aún más y seguir adelante.

Al **CONACyT** por la beca otorgada, además de la beca de apoyos complementarios para mujeres indígenas en su modalidad apoyo 1 y 2.

Y, por último, pero no menos importante a la **Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec** por abrimme las puertas nuevamente y brindarme las herramientas necesarias para mi formación como profesionista.

Contenido

Abreviaturas.....	7
Índice de figuras	8
Índice de tablas.....	9
Abstract	10
Resumen	11
1. Introducción.....	12
2. Marco Teórico.....	14
2.1 Energía.....	14
2.2 El hidrógeno (H ₂) como biocombustible	14
2.3 Producción de H ₂ por fermentación oscura.....	15
2.3.2 Generalidades de <i>Escherichia coli</i>	19
2.4 Sustratos orgánicos no convencionales.....	19
2.4.1 Malanga.....	20
2.4.2 Almidón	21
2.5 Tratamiento de sustratos orgánicos no convencionales.....	22
2.6 Molienda mecánica de alta energía (HEBM).....	23
2.6.1 Molino planetario de bolas	24
2.7 Azúcares reductores	25
2.7.1 Determinación de azúcares reductores	25
3. Antecedentes.....	27
4. Justificación	29
5. Hipótesis	30
6. Objetivos.....	30
6.1 Objetivo general.....	30
6.2 Objetivos específicos	30
7. Metodología	31
7.1 Obtención de <i>Colocasia esculenta</i>	31
7.1.1 Malanga taro	31
7.2 Tratamiento de <i>Colocasia esculenta</i> por HEBM.....	32
7.3 Determinación de azúcares reductores.....	32
7.4 Caracterización fisicoquímica de <i>Colocasia esculenta</i>	34
7.4.1 Espectrometría infrarroja (FT-IR-ATR).....	34
7.4.2 Análisis termogravimétrico (TGA)	34
7.5 Fermentación.....	35
7.5.1 Microorganismo	35
7.5.2 Inóculo.....	36
7.5.3 Medio de cultivo.....	36
7.5.4 Fermentación oscura	36
7.6 Determinación de H ₂ por cromatografía de gases (GC-TCD).....	38
8. Resultados y discusión.....	39
8.1 Secado de <i>Colocasia esculenta</i>	39

8.2 Molienda mecánica de alta energía (HEBM) de <i>Colocasia esculenta</i>	39
8.3 Determinación de azúcares reductores en <i>Colocasia esculenta</i>	40
8.4 Caracterización fisicoquímica de <i>Colocasia esculenta</i> modificada	42
8.4.1 Espectroscopía infrarroja (FT-IR-ATR) de <i>Colocasia esculenta</i>	42
8.4.2 Análisis termogravimétrico (TGA) de <i>Colocasia esculenta</i>	45
8.5 Fermentación oscura de <i>Escherichia coli</i>	49
8.6. Determinación de H ₂ por GC-TCD de la fermentación oscura de <i>E. coli</i>	53
9. Conclusión	58
10. Perspectivas del trabajo	59
11. Referencias bibliográficas	60

Abreviaturas

°C: grados Celsius.

Å: angstrom.

bio-H₂: bio-hidrógeno.

cm⁻¹: centímetros recíprocos.

cm²: centímetros al cuadrado

DNS: ácido 3,5-dinitrosalicílico.

DTA: análisis térmico diferencial (por sus siglas en inglés “Differential Thermal Analysis”).

FT-IR-ATR: espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier y reflectancia total atenuada (por sus siglas en inglés “Fourier Trasformation Infrared Attenuated Total Reflection”).

FWHM: anchura a la altura media de un pico (por sus siglas en inglés “Full Width at Half Maximum”).

GC: cromatografía de gases (por sus siglas en inglés “Gas Chromatography”).

h: horas.

HEBM: molienda mecánica de alta energía (por sus siglas en inglés “High Energy Ball Milling”).

min: minuto.

mV: milivoltio.

nm: nanómetros.

ORP: potencial de óxido-reducción (por sus siglas en inglés “Oxidation Reduction Potencial”).

rpm: revoluciones por minuto.

T: temperatura.

TCD: detector de conductividad térmica (por sus siglas en inglés “Thermal Conductivity Detector”).

TGA: análisis termogravimétrico (por sus siglas en inglés “Thermo Gravimetric Analysis”).

V: volumen.

V_{gas}: volumen de gas.

V_{inj}: volumen de inyección.

µL: microlitros.

Índice de figuras

Figura 1. Producción fermentativa de H₂ a partir de glucosa (C₆H₁₂O₆) por *Escherichia coli* (Vardar-Schara *et al.*, 2008).

Figura 2. Malanga, variedad *C. esculenta* y *C. antiquorum* (Ríos, 2014).

Figura 3. Estructura química base de la amilosa y la amilopectina (Urzua-Valenzuela, 2017).

Figura 4. Micro molino planetario de bolas (Fritsch, 2007; Suryanarayana, 2001).

Figura 5. Reacción general del método DNS (Dangkulwanich *et al.*, 2018).

Figura 6. Proceso de deshidratación de *C. esculenta*.

Figura 7. Sistema de almacenamiento de H₂ obtenido de la fermentación oscura con *E. coli*.

Figura 8. Muestras de *C. esculenta* antes y después de la HEBM.

Figura 9. Curva de calibración de glucosa (C₆H₁₂O₆) medida a 540 nm.

Figura 10. Concentración de azúcares reductores en *C. esculenta* antes y después de la HEBM.

Figura 11. Espectros IR de *C. esculenta* antes y después de la HEBM.

Figura 12. Espectros IR ampliado a 1200-900 cm⁻¹ de *C. esculenta* antes y después de la HEBM.

Figura 13. Termogramas de *C. esculenta* antes y después de la HEBM.

Figura 14. Análisis de los datos obtenidos del TGA de *Colocasia esculenta*.

Figura 15. Fermentación oscura de *E. coli* con glucosa (C₆H₁₂O₆).

Figura 16. Fermentación oscura de *E. coli* utilizando *C. esculenta*.

Figura 17. Fermentación oscura de *E. coli* con glucosa (C₆H₁₂O₆) para la medición de H₂.

Figura 18. Fermentación oscura de *E. coli* utilizando *C. esculenta* para la medición de H₂.

Figura 19. Acondicionamiento del equipo cromatógrafo de gases (GC).

Figura 20. Cromatogramas GC-TCD obtenidos a partir de la inyección de 5, 10, 15, 20 y 25 µL H₂ de puro.

Figura 21. Curva de calibración de H₂ puro (GC-TCD).

Figura 22. Cromatogramas GC-TCD obtenidos de la inyección de 15 µL de: H₂ puro (negro), bio-H₂ obtenido a partir de glucosa (rojo) y bio-H₂ obtenido a partir de *C. esculenta* (azul).

Índice de tablas

Tabla 1. Comparación del rendimiento de H₂ obtenido por fermentación oscura en diferentes cepas de *E. coli* y de sustratos (Hassan & Morsy, 2015).

Tabla 2. Preparación de las soluciones estándares de C₆H₁₂O₆.

Tabla 3. Composición del medio de glucosa (Poladyan *et al.*, 2020).

Tabla 4. Condiciones de separación y detección de H₂ (Toonen, 2013; Weijun, 2015; Recuperado de: https://www.restek.com/it/pagine/chromatogram-view/GC_MS01136).

Tabla 5. Características macroscópicas de *C. esculenta* después de la HEBM.

Tabla 6. Volumen de bio-H₂ de la fermentación oscura con glucosa.

Tabla 7. Volumen de bio-H₂ de la fermentación oscura con *C. esculenta*.

Tabla 8. Comparación del rendimiento de bio-H₂ obtenido por fermentación oscura con diferentes sustratos (Morales-Toledo, 2018).

Abstract

This study aims to use high-energy ball milling (HEBM) as an alternative for treating non-conventional organic substrates and their use as a supplement in culture media for hydrogen (H₂) producing microorganisms. The HEBM of malanga taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) was carried out at different times (5, 10, 20, 30, and 40 min), using stainless steel balls and bowls at 600 rpm. The determination of reducing sugars was carried out using the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method by visible spectrophotometry. Subsequently, the physicochemical characterization of the substrate before and after milling was carried out by Fourier transformation infrared attenuated total reflectance spectroscopy (FT-IR-ATR) and thermogravimetric analysis (TGA). It was determined that at 10 min of HEBM, the highest concentration of reducing sugars was obtained. By FT-IR-ATR, it was observed that the hydroxyl functional groups and glycosidic bonds presented the highest absorbance. Thermal decomposition of *C. esculenta*, analyzed by TGA, was carried out in three stages: 1) dehydration, 2) decomposition, and 3) residue formation. *C. esculenta* conditioned with 10 min of HEBM was chosen for dark fermentation with *E. coli*. In fermentation, it was observed that in a pH interval of 4.5 - 6.5, the production of gases with an oxidation-reduction potential (ORP) between 10-60 mV and an optical density between 0.8 - 2 was generated. The H₂ obtained from the dark fermentation with *E. coli* was determined by Gas Chromatography (GC) with a thermal conductivity detector (TCD). From the dark fermentation with glucose, 97 mL of gas was obtained with a biohydrogen purity of 56 %, while for *C. esculenta*, 77 mL of gas was obtained with 21 % purity.

Resumen

En el presente trabajo se propone el uso de la molienda mecánica de alta energía (HEBM, por sus siglas en inglés “High Energy Ball Milling”) como alternativa para el tratamiento de sustratos orgánicos no convencionales y su aprovechamiento como suplemento en medios de cultivos para microorganismos productores de hidrógeno (H₂). Para ello se realizó la HEBM de malanga taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) en diferentes tiempos (5, 10, 20, 30 y 40 min) a 600 rpm, utilizando bolas de acero inoxidable. Luego se realizó la determinación de la obtención de azúcares reductores, mediante el método de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) por espectrofotometría visible. Posteriormente se realizó la caracterización fisicoquímica del sustrato antes y después de la molienda por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier y reflectancia total atenuada (FT-IR-ATR, por sus siglas en inglés “Fourier Trasformation infrared Attenuated Total Reflection”) y análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés “Thermo Gravimetric Analysis”). Se logró determinar que a los 10 min de HEBM se obtuvo la mayor concentración de azúcares reductores, y por FT-IR-ATR se observó que los grupos funcionales hidroxilos y enlaces glucosídicos presenta la mayor absorbancia. Mediante TGA se analizó la descomposición térmica de *C. esculenta*, el cual se llevó a cabo en tres etapas: 1) deshidratación, 2) descomposición y 3) formación de residuos. Para realizar la fermentación oscura con *E. coli* se eligió *C. esculenta* acondicionada con 10 min de HEBM. En la fermentación se observó que en un rango de pH de 4.5-6.5 se genera la producción de gases con potencial de óxido-reducción (ORP por sus siglas en inglés “Oxidation Reduction Potencial”) de entre 10-60 mV y con densidad óptica de entre 0.8-2. Se determinó y cuantifico el H₂ obtenido de la fermentación oscura con *E. coli*, por cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés “Gas Chromatography”) con un detector de conductividad térmica (TCD, por sus siglas en inglés “Thermal Conductivity Detector”). A partir de la fermentación oscura con glucosa se obtuvo un volumen de 97 mL de gas total con una pureza de biohidrógeno de 56 %, mientras que para *C. esculenta* se obtuvo 77 mL con 21 % de pureza.

1. Introducción

El uso de energías no renovables como los combustibles fósiles (petróleo, carbón, gas natural) son indispensables para abastecer todo tipo de bienes y servicios necesarios para la población mundial. Sin embargo, la producción y uso de estas energías ha generado graves problemas ambientales, y al mismo tiempo su explotación continua está ocasionando su agotamiento. Por lo que es importante encontrar otras alternativas que puedan satisfacer esta demanda energética y sean menos nocivas para el medio ambiente.

Las energías renovables han demostrado ser la alternativa menos perjudicial para el medio ambiente. Estas se encuentran en la naturaleza en una cantidad ilimitada, una vez consumidas vuelven a integrarse de manera natural de donde provienen y de la misma manera pueden volver a regenerarse. Entre los diferentes tipos de energías renovables se encuentran: energía hidráulica, energía eólica, energía solar, energía geotérmica, energía mareomotriz y energía de la biomasa. La energía de la biomasa procede del aprovechamiento de la materia orgánica, abarcando un amplio conjunto de materias orgánicas que se caracterizan por su heterogeneidad, su origen y su naturaleza. La biomasa puede transformarse en energía a través de cuatro procesos básicos: combustión, digestión anaerobia, gasificación y pirólisis.

Dentro de los diferentes tipos de energía renovable, el uso del hidrógeno (H_2) es una de las energías renovables más prometedoras, aunque a la fecha su producción y almacenamiento resulta costoso en comparación con otras fuentes de energía. Aunque existen muchas metodologías empleadas en la generación de H_2 (por ejemplo, la electrolisis del agua o la gasificación del carbón, entre otros) existe una constante búsqueda de procesos que permitan altos rendimientos de H_2 y que no perjudiquen el ambiente. Uno de estos procesos es la fermentación oscura, la cual requiere de bacterias anaerobias y sustratos ricos en glucosa y/o almidón. Además, el uso de sustratos orgánicos no convencionales como alternativa al uso de sustratos comerciales podría disminuir de manera significativa los costos en la producción del H_2 . Esto debido a que se encuentran disponibles abundantemente en la naturaleza, por lo que no se requiere producirlos como los sustratos comerciales. El problema con el uso de fuentes no

convencionales como sustrato es la necesidad de un tratamiento que permita romper las macromoléculas que lo conforman para hacer biodisponibles los azúcares. Los tratamientos más utilizados son la hidrólisis acida y la hidrólisis enzimática. Sin embargo, el primer tratamiento genera grandes cantidades de desechos al producir efluentes químicamente agresivos para el ambiente mientras que el segundo representa un alto costo económico derivado del uso de enzimas.

En trabajos previos se ha reportado el uso de la molienda mecánica de alta energía (HEBM) como método alternativo para el tratamiento de sustratos orgánicos no convencionales. Se ha descrito que el uso de la HEBM favorece la obtención de azúcares reductores al generar rupturas en las macromoléculas además de generar cambios en las propiedades fisicoquímicas de la biomasa como incremento de la hidrosolubilidad y disminución de la cristalinidad, entre otros. Además, este método no genera contaminantes ni residuos y el proceso es mucho más rápido.

De acuerdo con lo anterior, en este trabajo se propuso el uso de la HEBM para aumentar la disposición de azúcares reductores en *Colocasia esculenta* para la producción de H₂ por fermentación oscura utilizando *Escherichia coli*.

2. Marco Teórico

2.1 Energía

El término energía deriva del griego *energós*, que significa “fuerza de acción” o “fuerza de trabajo”, y de *enérgeia* que significa “actividad” u “operación”. El término se emplea en diferentes áreas como la física, química, economía y tecnología, entre otros, por lo que su acepción es variable. De allí que energía se relacione con las ideas de fuerza, almacenamiento, movimiento, transformación o funcionamiento. De manera general la energía se define como la capacidad que poseen los cuerpos para poder efectuar un trabajo a causa de su constitución (energía interna), de su posición (energía potencial) o de su movimiento (energía cinética). A diferencia de la materia la energía no puede verse, tocarse, olerse o pesarse; por lo que únicamente se reconoce por sus efectos (Chang & García, 2006).

Aunque existen diferentes tipos, dependiendo de su origen la energía se puede clasificar en dos grupos: a) no renovables y b) renovables.

- a) La energía no renovable es aquella que se encuentra en forma limitada en la Tierra. Se obtiene principalmente de combustibles fósiles (gas natural, carbón y petróleo) y de la energía nuclear (por fisión y fusión nuclear). La desventaja de estos recursos es que generan contaminantes y se pueden agotar con el tiempo.
- b) Las energías renovables son aquellas que tras ser utilizadas se pueden regenerar de manera natural o incluso artificial, ya que utilizan recursos ilimitados de la naturaleza. Además, generan un menor impacto negativo al ambiente. Entre ellas tenemos a las energías: geotérmica, hidráulica, eólica, solar y la producida a través de la biomasa (Zohuri *et al.*, 2022).

2.2 El hidrógeno (H₂) como biocombustible

El hidrógeno es el elemento más abundante en el universo, constituyendo el 75% de su masa total. Bajo condiciones ordinarias en la Tierra, el gas hidrógeno es una molécula diatómica (H₂), inodora, incolora, insípida, no tóxica y ligera. En la naturaleza el hidrógeno

casi siempre se encuentra combinado con otros elementos, está presente en el agua y por lo tanto en todos los organismos vivos. También está presente en hidrocarburos y en varios otros compuestos naturales y artificiales (Chang & García, 2006).

El término biocombustible se refiere a combustibles líquidos o gaseosos para el sector del transporte que se producen predominantemente a partir de biomasa. La producción a gran escala de biocombustibles ofrece la oportunidad de reducir la dependencia hacia los combustibles fósiles (Balat & Kirtay, 2010; Fan *et al.*, 2021).

El H₂ tiene un alto contenido energético 120 MJ/Kg comparado con la gasolina 44.4 MJ/Kg (Graetz, 2009). En términos de número de octanaje el H₂ tiene 130 octanos, mientras que la gasolina 87 (Magna) y 92 (Premium) octanos (Hernández & Bonilla, 2020). Para una comparación directa, 3 kg de gasolina (o 1 galón = 3,79 L) tiene la misma energía que 1 kg de H₂, pero la gasolina produce aproximadamente 9 kg de dióxido de carbono (CO₂) mientras que la combustión de H₂ sólo genera agua (H₂O) como subproducto (Reacción 1) (Graetz, 2009).



La producción de H₂ se realiza mediante diversos métodos que requieren la separación del hidrógeno de otros elementos químicos. El 40% del H₂ se obtiene a partir de gases naturales, el 30% del petróleo, el 18% de carbón, el 4% mediante electrólisis y alrededor del 1% de la biomasa (Sinha & Pandey, 2011).

2.3 Producción de H₂ por fermentación oscura

La producción de H₂ mediante procesos biológicos se ha enfocado principalmente en tres métodos: la fotólisis del agua empleando algas y cianobacterias; la fotofermentación de compuestos orgánicos por bacterias fotosintéticas; y la fermentación oscura bajo condiciones anaeróbicas utilizando carbohidratos. Este último ha resultado ser el más favorable entre los procesos de bio-producción de H₂ (Show *et al.*, 2011). Además, en la fermentación oscura se pueden utilizar y aprovechar también los desechos orgánicos procedentes de la agricultura y/o de las industrias (Ghimire *et al.*, 2015).

Sin embargo, en la práctica se obtienen bajas producciones de H₂ debido a que parte del sustrato es empleado por los microorganismos para su sustento y crecimiento. La

producción de H₂ depende de varios factores asociados con las condiciones: ambientales (temperatura e inóculo), operacionales (presión parcial de H₂) y químicas (pH del cultivo, tipos de nutrientes y sustratos) (Argun & Kargi 2011; Sinha & Pandey, 2011).

La generación de H₂ a través de fermentación oscura se logra principalmente por bacterias anaerobias estrictas o anaerobias facultativas. Las bacterias anaerobias estrictas son aquellas que para crecer en un medio de cultivo necesitan una atmósfera sin oxígeno (O₂), ya que esta molécula es tóxica para ellas. En general se utilizan especies del género *Clostridium* y las acidogénicas anaerobias provenientes de lodos. Las bacterias anaerobias facultativas son capaces de crecer en atmosferas sin O₂ (anaerobiosis) y con O₂ (aerobiosis), dependiendo de la cantidad de O₂ y del material fermentable en el medio ambiente. Las bacterias facultativas utilizadas generalmente son de los géneros *Enterobacter* (*Escherichia*), *Bacillus* y algunas bacterias termófilas (Chong *et al.*, 2009; Gopalakrishnan *et al.*, 2019; Hassan & Morsy, 2015). Los anaerobios facultativos, como *E. coli*, han demostrado tener un alto potencial en la producción de H₂ a partir de azúcares simples. Los hidratos de carbono, principalmente glucosa (C₆H₁₂O₆), son los sustratos preferidos para la producción de H₂ por fermentación. De acuerdo con la literatura, las bacterias anaerobias facultativas tienen un rendimiento máximo teórico de 2 moles de H₂ por cada mol de C₆H₁₂O₆ consumida, mediante la vía metabólica de la glucólisis (Redwood & Macaskie, 2006; Vardar-Schara *et al.*, 2008). Además, el almidón y la celulosa, así como los desechos orgánicos se pueden utilizar también como sustratos (Tabla 1) (Ghimire *et al.*, 2015; Hassan & Morsy, 2015).

Tabla 1. Comparación del rendimiento de H₂ obtenido por fermentación oscura en diferentes cepas de *E. coli* y de sustratos (Hassan & Morsy, 2015).

Microorganismo	Sustrato	Rendimiento (mol H ₂ /mol glucosa)
<i>E. coli</i> W3110	Glucosa	0.54
<i>E. coli</i> ZF3	Glucosa	0.96
<i>E. coli</i> S3	Glucosa	0.85
<i>E. coli</i>	Glucosa	0.17
<i>E. coli</i> Δldn	Glucosa	0.23
<i>E. coli</i> HD701	Maleza hidrolizada con ácido	0.46
<i>E. coli</i> HD701	Residuos de almidón de papa hidrolizada con ácido	0.45

Dependiendo de las vías utilizadas por los microorganismos y los productos finales, los rendimientos de H₂ pueden ser variables. La ruta fermentativa de *E. coli* para la producción de H₂, comienza con la conversión de glucosa a piruvato y nicotinamida adenina dinucleótida (NADH), a través de la glucólisis tanto en estado anaeróbico estricto como facultativo (Figura 1). El piruvato se convierte luego en acetil-CoA y formiato, que es catalizado por el piruvato formiato liasa (PFL). Como productos finales de la fermentación se producen succinato, lactato, acetato, etanol y formiato. El H₂ se produce a partir de formiato por el complejo multienzimático formiato hidrógeno liasa (FHL), en condiciones anaeróbicas y en ausencia de aceptores de electrones como O₂ y nitrato (NO₃⁻). El sistema FHL es controlado por un activador transcripcional *FhlA*, que se requiere para la transcripción de *fdhF* y el operón *hyc*, y un regulador transcripcional negativo, *hycA*. La transcripción del complejo FHL depende de la presencia de formiato, pH ácido y el factor s54. Hay varios factores que influyen en el rendimiento, tales como si parte del piruvato se convierte en lactato. Las proteínas que se muestran en negrita con un asterisco en la Figura 1, han sido estudiados mediante ingeniería metabólica para mejorar la producción de biohidrógeno (Rosales-Colunga & De León Rodríguez, 2014; Stanbury *et al.*, 2017; Vardar-Schara *et al.*, 2008).

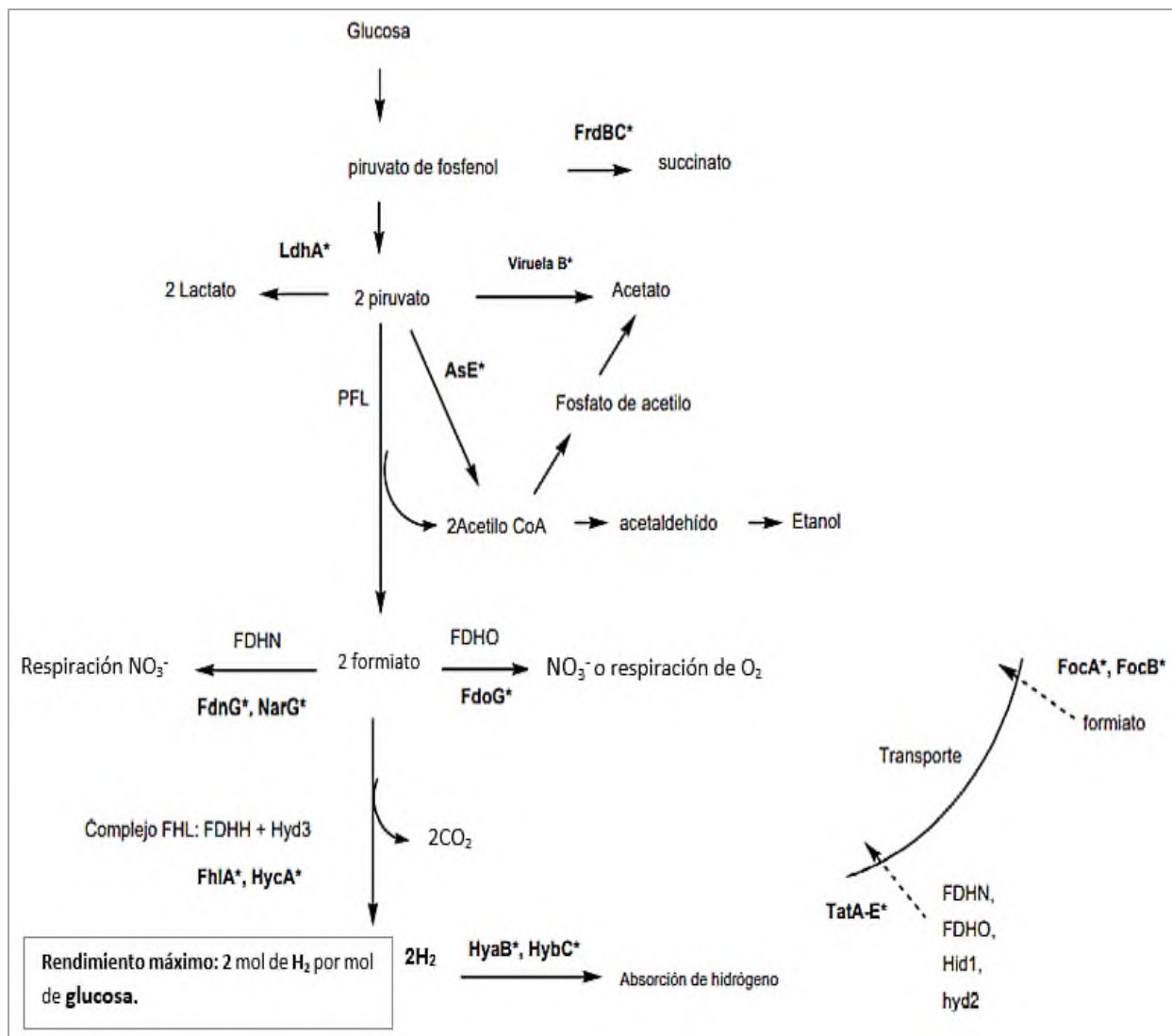


Figura 1. Producción fermentativa de H₂ a partir de glucosa (C₆H₁₂O₆) por *Escherichia coli*. PFL, piruvato formiato liasa; FDH, formiato deshidrogenasa; FHL, formiato de hidrógeno liasa; Hyd, hidrogenasa; CoA, coenzima A (Vardar-Schara *et al.*, 2008).

2.3.2 Generalidades de *Escherichia coli*

Escherichia coli fue descrita por Theodore von Escherich en 1885, quien la denominó *Bacterium coli commune*, pero en 1919 fue renombrada con el nombre actual en honor a su descubridor. *Escherichia coli* son bacilos gram negativos, oxidasa negativos, con un tamaño promedio de 1.1-1.5 μm de ancho y 2.0-6.0 μm de largo. Es una bacteria mesófila con una temperatura óptima de crecimiento para la mayoría de las cepas, de 39 °C, con una temperatura mínima de 8 °C y una máxima de 48 °C. *Escherichia coli* pertenece a la familia de las bacterias entéricas, es anaerobia facultativa, ya que es capaz de crecer en presencia de O₂ a través de la respiración aeróbica, o en ausencia de este a través de la respiración o la fermentación anaeróbica. Es ubicua, siendo una de las especies bacterianas más abundantes. *Escherichia coli* forma parte de la microbiota normal del tracto digestivo gastrointestinal del ser humano, de algunos mamíferos y aves. Es un microorganismo utilizado como modelo para la investigación e ingeniería genética, a menudo como anfitrión para expresar genes pertenecientes a otras especies. Debido a su rápido crecimiento, *Escherichia coli* tiene la capacidad de sobrevivir con diferentes tipos de nutrientes y crecer a distintas condiciones de temperatura. Además, su disponibilidad de aceptores de electrones desencadena las estrategias utilizadas para la producción de energía a través de la respiración o fermentación (Förster & Gescher, 2014; Madigan *et al.*, 2009).

2.4 Sustratos orgánicos no convencionales

La mayoría de los microorganismos de importancia industrial son heterótrofos, es decir, que aprovechan los compuestos con carbono para realizar su metabolismo y crecimiento. Los carbohidratos son la fuente orgánica de energía más utilizada a nivel industrial para la fermentación, sin embargo, representan altos gastos en su producción. Con el objetivo de reducir tales costos se utilizan sustratos orgánicos no convencionales que se obtienen de la biomasa (Balat & Ayar, 2005; Chong *et al.*, 2009). La biomasa es toda la materia orgánica no fósil que tiene un contenido de energía química intrínseca, en esta se incluyen la silvicultura (cultivos agrícolas, árboles y plantas) y desechos orgánicos

(agrícolas, agroindustriales y domésticos) (Balat & Ayar, 2005; Balat & Kirtay, 2010; Ghimire *et al.*, 2015).

2.4.1 Malanga

La malanga es un tubérculo de clima tropical y subtropical, que se cultiva en suelos con altos contenidos de humedad, aunque también puede soportar períodos de sequía, gracias a sus tubérculos. Es originario de África, Asia y Oceanía, pero debido a la inmigración a occidente, actualmente también se cultiva en América (Ríos, 2014). Pertenece a la familia de las *Araceae* y al género *Colocasia*. Dentro del género se consideran dos variedades taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) e isleño (*Colocasia esculenta* var. *antiquorum*). Los cuales se pueden diferenciar en base a su morfología floral. Donde *C. esculenta* posee apéndice estéril del espádice expuesto, que es mucho más corto que la porción masculina. Mientras que *C. antiquorum* posee apéndice estéril del espádice retenido dentro de la espata, que es más largo que la porción masculina (Wang, 1932). A continuación, se describe las características de cada variedad:

- ***Colocasia esculenta***

Es una planta herbácea, perenne, suculenta, que se desarrolla entre 1-2 m de altura. Producen en su base un cormo principal comestible y grande (esférico, elipsoidal o cónico) con pocos cormos (a veces llamados cormos retoños, cubiertos exteriormente por escamas fibrosas o lisos) entre cuatro u ocho aproximadamente (Figura 2 a). En general, este grupo tiene veintiocho cromosomas y se puede cultivar en una amplia gama de condiciones, desde regiones con inundaciones hasta tierras altas de secano. El color de su pulpa por lo general es blanco, pero también pueden presentarse clones coloreados hasta llegar al morado (Ríos, 2014; Wang, 1932).

- ***Colocasia antiquorum*:**

Es también una planta herbácea, perenne, suculenta, comúnmente alcanzan una altura de hasta 2.5 m. Producen en su base un cormo principal alargado (de forma

ovoide de tamaño pequeño o mediano que a menudo puede no ser comestible debido a su acidez) y una gran cantidad de pequeños cormos comestibles entre quince o veinte, hasta cuarenta o más (Figura 2 b). En su parte superior se ubica la corona y está vinculada al origen de los tallos o peciolos. Mientras que su parte inferior es la base del cormo y está asociada a la raíz (Figura 2 c). Algunos cormelos pueden poseer cierto grado de latencia. Generalmente, este grupo tiene cuarenta y dos cromosomas y se cultiva como un cultivo de regadío como muchas otras hortalizas o como un cultivo de secano. Este grupo de plantas probablemente se desarrolló en Japón o China. El color de su pulpa es blanco con vetas lilas o violetas (Ríos, 2014; Wang, 1932).

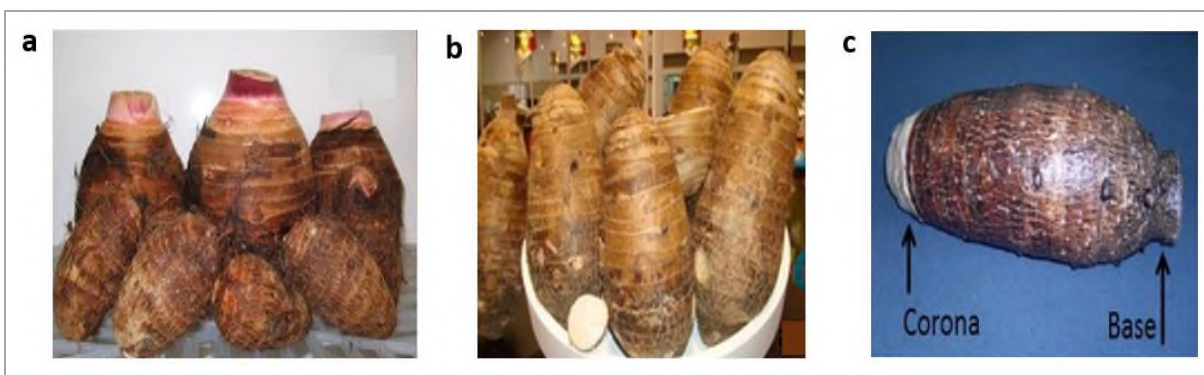


Figura 2. Malanga, variedad (a) *C. esculenta* y (b) *C. antiquorum* (Ríos, 2014).
(c) Corona y base de un cormo de malanga.

Una de las características más destacables de la malanga es su valor nutricional, principalmente por su alto contenido de almidón (>80 %), proteínas (1.4-7 %), fibra (0.6-0.8 %), retinol (vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), calcio y fósforo (Calleja-Viveros *et al.*, 2021).

2.4.2 Almidón

El almidón es un polisacárido de reserva el cual se encuentra principalmente en fuentes como los cereales (35 al 80%), en las raíces (30 a 70%), en los tubérculos (65 a 90%) y en las legumbres (25 a 50%) y en algunas frutas inmaduras como los plátanos o los mangos (~70% en peso seco). La estructura granular del almidón se debe a sus dos macromoléculas principales, la amilosa (Figura 3 a) y la amilopectina (Figura 3 b), las

cuales le otorgan su organización física y por ende sus propiedades fisicoquímicas y funcionales (Alcázar-Alay & Meireles, 2015; Hernández-Medina *et al.*, 2008).

La amilosa es un polímero, producto de la condensación de D-glucopiranosas unidas por enlaces glucosídicos α (1-4) que forma largas cadenas lineales cuya unidad repetida es α -maltosa con 200-2500 unidades en un número de cadenas que van de 1 a 20. Representa de un 25-30% del contenido de almidón total. La amilopectina es un polímero compuesto por la unión de unidades de α -D-glucosa a través de enlaces glucosídicos α (1-4) y ramificaciones de α (1-6) que están constituidas por cientos de cadenas cortas. La semicristalinidad del almidón es debido a la amilopectina y constituye de un 70-85% del almidón nativo. Mientras que la parte amorfa está formada por regiones ramificadas de amilopectina y amilosa (Urzua-Valenzuela, 2017).

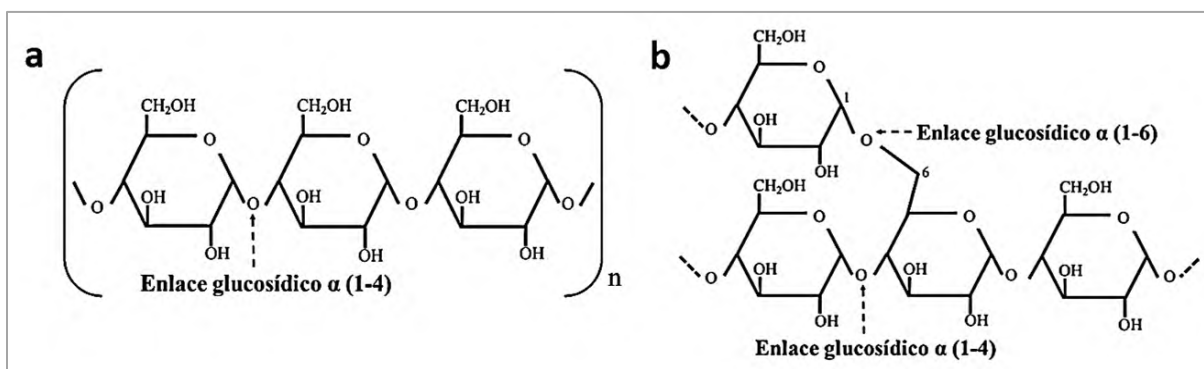


Figura 3. Estructura química base de la amilosa y la amilopectina (Urzua-Valenzuela, 2017).

2.5 Tratamiento de sustratos orgánicos no convencionales

Las impurezas presentes en los sustratos orgánicos no convencionales pueden provocar efectos negativos en el crecimiento celular, inhibición o reacción con los compuestos presentes en el medio de cultivo haciendo que los nutrientes sean menos accesibles para los microorganismos. Por lo que deben ser sometidos a tratamientos para maximizar el aprovechamiento de estas fuentes de carbono, además de hacerlos más asimilables, transformándolas a compuestos fermentables y de fácil disponibilidad (Barakat *et al.*, 2014; Chong *et al.*, 2009). Existe una gran variedad de métodos de tratamientos utilizados para generar modificaciones en sustratos orgánicos no

convencionales. Estos pueden ser físicos, químicos, biológicos, o una combinación de ellos. De manera general, estos deben de ser de menor costo, de bajo consumo energético, de uso de reactivos no nocivos y/o fácilmente recuperables, y fáciles de aplicar a diversos sustratos (Barakat *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2009).

Dentro de los tratamientos más empleados se encuentran la hidrólisis ácida y la hidrólisis enzimática. La hidrólisis ácida es un proceso químico que, mediante el empleo de catalizadores ácidos, transforma las cadenas de polisacáridos en monómeros elementales; sin embargo, produce efluentes químicamente agresivos para el ambiente y la salud. La hidrólisis enzimática es un proceso catalizado por un grupo de enzimas cuya acción conjunta produce la degradación de la biomasa: aunque, requiere de una optimización para poder obtener la mejor combinación de enzimas específicas para cada materia prima y estas enzimas regularmente no pueden adaptarse rápidamente al sustrato (Sun & Cheng, 2002). Sin embargo, existen métodos emergentes como los tratamientos mecánicos (molienda mecánica de alta energía), los cuales reducen las dimensiones de los sustratos mediante la ruptura de sus paredes celulares, generando así enlaces más simples (cadenas cortas de C-C como mono- y/o di-sacáridos) a partir de enlaces más complejos (cadenas largas de C-C como los polisacáridos). Esto permite que los microorganismos asimilen los compuestos presentes en la biomasa, al incrementar la biodegradabilidad anaeróbica, además de aumentar su superficie, disminuir su cristalinidad, aumentar su digestibilidad y su bioconversión (Barakat *et al.*, 2014; Juarez-Arellano *et al.*, 2021).

2.6 Molienda mecánica de alta energía (HEBM)

La mecanoquímica es una técnica de procesamiento de polvos que involucra la deformación, fractura y soldadura de partículas provocadas por la energía intercambiada durante las colisiones repetidas de las bolas durante la molienda mecánica de alta energía (HEBM). La energía mecánica generada permite activar reacciones químicas y cambios estructurales, así como la reducción del tamaño de las partículas, obteniendo polvos con estructuras cristalinas difíciles de alcanzar con otras técnicas, lo que puede

derivar en el mejoramiento de sus propiedades físicas (Sopicka-Lizer, 2010; Suryanarayana, 2011).

Existen diferentes tipos de molinos: de martillos, rodillos, discos, bolas, entre otros. Estos difieren principalmente en la energía mecánica que genera, en su capacidad, velocidad y temperatura de operación; así como de algunas otras características de control (Fritsch, 2007; Suryanarayana, 2001).

2.6.1 Molino planetario de bolas

Los molinos planetarios de bolas deben su nombre al movimiento planetario de sus viales (Figura 4 a). Estos están dispuestos en un disco de soporte giratorio y un mecanismo de accionamiento especial que hace que giren alrededor de sus propios ejes. La fuerza centrífuga producida por los viales al girar alrededor de sus propios ejes y la producida por el disco de soporte giratorio actúan sobre el contenido del vial (bolas de molienda y la muestra de interés). Debido a que los tazones y el disco de soporte giran en direcciones opuestas, las fuerzas centrífugas actúan en direcciones opuestas. Esto hace que las bolas trituren por efecto de la fricción al colisionar con la pared interior del tazón y por efecto del impacto de las bolas (Figura 4 b) (Fritsch, 2007; Suryanarayana, 2001).

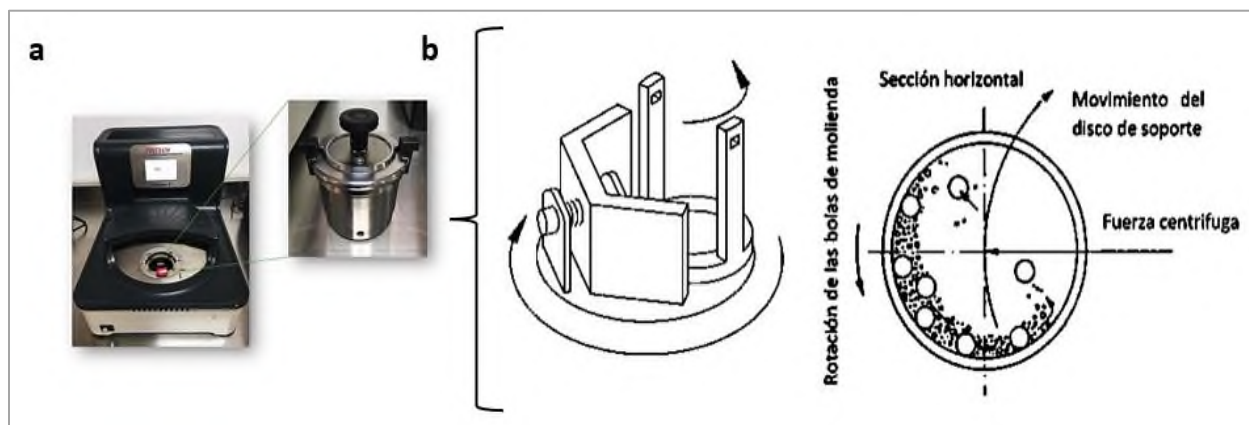


Figura 4. Mecanismo de acción de un molino planetario de bolas (Fritsch, 2007; Suryanarayana, 2001).

La molienda mecánica puede realizarse en seco o en húmedo, en muestras inorgánicas y orgánicas. Además, este tipo de molino cumple técnicamente con todos los requisitos

para la molienda coloidal y cuentan con el rendimiento energético necesario para promover reacciones químicas (mecanosíntesis) (Fritsch, 2007; Sant'Ana da Silva *et al.*, 2010).

2.7 Azúcares reductores

Los azúcares reductores son aquellos azúcares que poseen su grupo carbonilo del carbono anomérico intacto, y a través de este pueden reaccionar como agentes reductores con otras moléculas que actúan como agentes oxidantes. Esta propiedad permite determinar la concentración de azúcares presentes en una disolución de una muestra de interés, midiendo la cantidad de agente oxidante que es reducido (Burgos, 2020).

2.7.1 Determinación de azúcares reductores

Miller desarrolló un método para determinar azúcares reductores utilizando el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). El cual reacciona con los azúcares reductores presentes en una muestra en condiciones de pH alcalino, reduciéndolo a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (Figura 5 a), provocando un cambio en el color de la muestra que se oxida dando como resultado una apariencia rojo-café (Figura 5 b) (Dangkulwanich *et al.*, 2018; Miller, 1959). El método DNS reacciona únicamente con los azúcares reductores presentes en la muestra mediante una reacción redox (Miller, 1959).

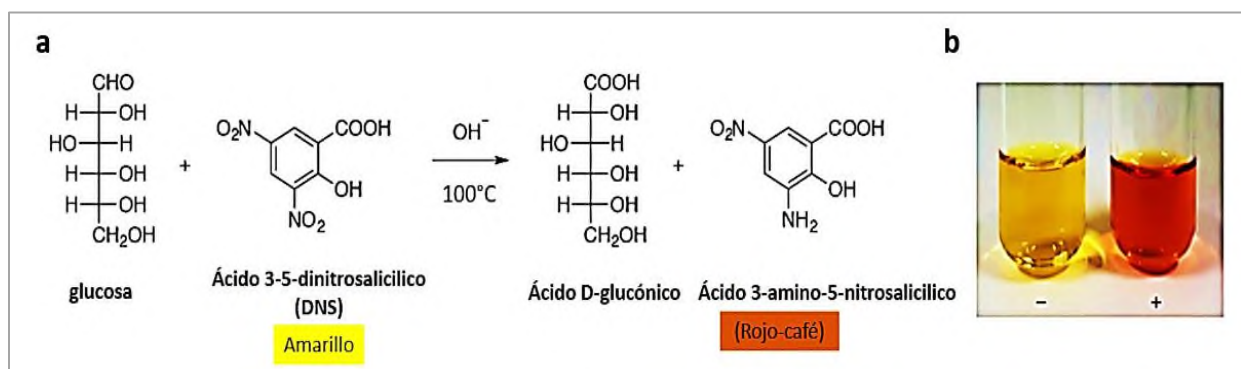


Figura 5. Reacción general del método DNS (Dangkulwanich *et al.*, 2018).

La cantidad de azúcares reductores en la muestra se puede determinar aplicando la ley de Beer-Lambert (ecuación 1), que establece que la absorbancia se relaciona con las propiedades ópticas en solución del analito, su concentración y la longitud del haz de radiación al atravesar la muestra. Donde A es la absorbancia; a , el coeficiente de absorptividad molar; b , la longitud del haz en el medio absorbente, y c , la concentración de la especie absorbente.

$$A = abc \quad Ec. 1$$

Con el fin de determinar los azúcares reductores, se mide la absorbancia de las soluciones de calibración de concentración conocida y se elabora una función de regresión lineal. Al sustituir los valores de absorbancias de las muestras de interés en la ecuación 1, obtenidas a una longitud de onda de 540 nm se calcula la concentración de azúcares reductores (Burgos, 2020; Swinehart, 1962).

3. Antecedentes

Dentro de la literatura se encuentran algunos estudios sobre el uso de la HEBM como tratamiento de sustratos orgánicos no convencionales.

Barakat *et al.* (2014) propusieron el uso de tratamiento mecánico, como método sencillo y ecológicos de modificación de biomasa lignocelulósica para la producción de biocombustible. De acuerdo con sus estudios, el tratamiento mecánico permite la separación de la biomasa en diferentes fracciones (tejidos, células, polímeros, etc.) para su posterior uso como materia prima en diversas aplicaciones. Este método reduce en gran medida el tamaño de las partículas de biomasa y posiblemente afecta su estructura molecular estructural facilitando la accesibilidad enzimática, además de aumentar su superficie, disminuir la cristalinidad de la celulosa y aumentar la digestibilidad y bioconversión de la biomasa.

Navarro-Mtz *et al.* (2017) produjeron H₂ por pirólisis de sustratos orgánicos no convencionales (soya, yuca y raquis de plátano). En su trataron los sustratos con molienda de alta energía (HEBM). Donde concluyeron que la HEBM favorece la biodisponibilidad de los sustratos para los microorganismos, debido al aumento del contenido de azúcares reductores. Además, consideraron el uso directo de la HEBM como un tratamiento alternativo menos perjudicial para el medio ambiente (ya que no genera desechos), asimismo de ser más económico, más rápido y fácil en su operación.

Urzua-Valenzuela (2017) utilizó la HEBM, para realizar modificaciones en las propiedades fisicoquímicas de distintos sustratos orgánicos no convencionales (soya, yuca, plátano, frijol y jinicuil) con posible uso en medios de cultivo. De acuerdo con sus resultados, la HEBM genero cambios estructurales, pérdida de cristalinidad, incremento en la concentración de azúcares reductores (importante para su biodisponibilidad en microorganismos) y mejoramiento de la solubilidad en los sustratos.

Morales-Toledo *et al.* (2018) estudio el efecto de la HEBM en las propiedades fisicoquímicas de distintos sustratos orgánicos no convencionales con posible uso en medios de cultivo para la producción de H₂ por fermentación oscura. En sus resultados demostró que el uso de la HEBM genera un aumento en el contenido de azúcares

reductores. Las mayores concentraciones se presentaron en la malanga isleña (20 min), el taro chino (20 min) y el raquis de plátano (40 min), aumentando 4.8 veces, 4.5 veces y 3 veces respectivamente, comparado con las muestras sin tratamiento. Además, reportaron que el incremento de las concentraciones de azúcares reductores usando HEBM es en algunos casos parecido o incluso más elevado que los obtenidos por hidrólisis ácida, enzimática o por ultrasonido. También reportaron que los sustratos modificados fueron asimilados por *E. coli*. Por tanto, consideran que la HEBM puede ser un método de tratamiento de un solo paso, fácil y de bajo costo para aumentar la concentración de azúcares reductores de fuentes de biomasa y que son biodisponibles.

Finalmente, con lo que respecta a la determinación y cuantificación de hidrógeno (H_2). Weijun (2015) realizó un estudio sobre la precisión analítica de la medición de H_2 mediante cromatografía de gases (CG) con una columna de tamiz molecular de 5 Å, utilizando nitrógeno (N_2) como gas portador y un detector de conductividad térmica (TCD). En el estudio se concluyó que con esta metodología es posible realizar la determinación y cuantificación precisa del H_2 , siempre y cuando se consideren los parámetros de operación del equipo durante el análisis.

4. Justificación

Debido a los problemas ambientales que causa el uso de los combustibles fósiles, existe una búsqueda continua de fuentes de energía renovables. El uso del H₂ es considerado una de las alternativas más prometedoras como biocombustible. Se sabe que el H₂ tiene un alto contenido energético, en términos de número de octanaje el H₂ tiene 130 octanos, mientras que la gasolina 87 (Magna) y 92 (Premium). Además, el H₂ es un gas no tóxico, ligero y se puede producir mediante procesos fermentativos, utilizando sustratos orgánicos no convencionales. Dichos sustratos ofrecen grandes ventajas, ya que son abundantes, baratos y biodegradables. La desventaja de su uso radica en el proceso extra de conversión de los carbohidratos a azúcares reductores para incrementar su solubilidad y mejorar su biodisponibilidad para los microorganismos. Por ende, es indispensable someter a los sustratos orgánicos no convencionales a tratamientos que favorezcan la obtención de azúcares reductores.

En este trabajo se propone el uso de la molienda mecánica de alta energía para aumentar el contenido de azúcares reductores del sustrato orgánico no convencional *Colocasia esculenta* para la producción de H₂ por fermentación oscura utilizando *Escherichia coli*.

5. Hipótesis

La molienda mecánica de alta energía aumentará el contenido de azúcares reductores en *Colocasia esculenta*, lo que favorecerá la producción de hidrógeno por fermentación oscura utilizando *Escherichia coli*.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Obtener azúcares reductores en *Colocasia esculenta* mediante la molienda mecánica de alta energía para su posterior uso en la producción de hidrógeno por fermentación oscura utilizando *Escherichia coli*.

6.2 Objetivos específicos

1. Realizar la molienda mecánica de alta energía de *Colocasia esculenta*.
2. Caracterizar fisicoquímicamente *Colocasia esculenta* antes y después de la molienda mecánica de alta energía.
3. Evaluar el uso de la *Colocasia esculenta* modificada como fuente de carbono para el crecimiento de *Escherichia coli*.
4. Estandarizar una técnica para la determinación de hidrógeno por cromatografía de gases.
5. Determinar la producción de hidrógeno de *Escherichia coli* por fermentación oscura mediante cromatografía de gases.

7. Metodología

7.1 Obtención de *Colocasia esculenta*.

7.1.1 Malanga taro

La malanga de la variedad taro (*Colocasia esculenta*), se obtuvo en el Ejido Sebastopol, ubicado en la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca. Se le realizó un lavado para retirar la suciedad y la tierra. Posteriormente se cortó en rodajas de aproximadamente 0.5 cm de grosor sin retirar su cáscara. Luego se pesó la malanga en rodajas y se colocó en charolas de aluminio para ser llevada a secado. Este proceso de deshidratación se realizó en un horno (marca BINDER, modelo FD-56-UL) a 60°C (Figura 6).



Figura 6. Proceso de deshidratación de *C. esculenta*.

Al alcanzar un peso constante, después de aproximadamente una semana, las rodajas de malanga seca se guardaron en bolsas de plástico al vacío para su posterior uso.

7.2 Tratamiento de *Colocasia esculenta* por HEBM

Para el tratamiento de *C. esculenta* por HEBM, se utilizó un molino planetario de bolas (marca Fritsch, modelo Pulverisette 7 *premium line*). Donde se colocó 5 g de muestra en cada tazón de 80 mL, con 15 bolas de acero inoxidable de 10 mm de diámetro. Se realizó la HEBM a una velocidad fija de 600 rpm con diferentes tiempos de molienda: 5, 10, 20, 30 y 40 min. Se consideraron ciclos de 5 min de molienda y 5 min de enfriamiento para evitar modificaciones del sustrato por sobrecalentamiento.

7.3 Determinación de azúcares reductores

Para la determinación de los azúcares reductores se utilizó la técnica de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

A. Preparación del reactivo DNS

1. En una balanza analítica (marca VELAB, modelo: VE-210) se pesó 1.6 g de hidróxido de sodio (NaOH). Este reactivo se disolvió con precaución en 50 mL de agua destilada (reacción exotérmica) en un vaso de precipitado de 250 mL. Se le aplicó agitación constante a esta solución, utilizando una parrilla de calentamiento con agitación magnética (marca Cole-Parmer, modelo ST-200-MP5).
2. Luego se pesó 30 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), y se añadió lentamente a la solución anterior hasta disolverse por completo.
3. Posteriormente se pesó 1 g de DNS, y se añadió a la solución de NaOH y $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.
4. Una vez disueltos todos los reactivos se procedió a transvasar la solución a un matraz aforado de 100 mL.
5. Al vaso de precipitado que contenía la solución se le realizaron tres lavados con agua destilada. El agua de enjuague fue vertida al matraz aforado.
6. Después, la solución del matraz se aforo a 100 mL con agua destilada.
7. Finalmente, el reactivo se guardó en un frasco ámbar para su posterior uso.

B. Preparación de la solución madre de glucosa

1. Para poder realizar la curva de calibración se preparó una solución madre de glucosa ($C_6H_{12}O_6$) a 1 g/L a partir del cual se prepararon las soluciones estándares.
2. Para la curva de calibración se prepararon soluciones estándares de $C_6H_{12}O_6$. Las cuales se prepararon utilizando la solución madre de glucosa de 1g/L (Tabla 2), preparada con 0.02 g de $C_6H_{12}O_6$ y 20 mL de agua destilada.

Tabla 2. Preparación de las soluciones estándares de glucosa ($C_6H_{12}O_6$).

Tubo	Volumen del diluyente (H_2O , mL)	Volumen de la solución madre de $C_6H_{12}O_6$ (mL)	Concentración final (g/L)
1	0	5	1
2	1	4	0.8
3	2	3	0.6
4	3	2	0.4
5	4	1	0.2

3. Posteriormente se colocó 1.5 mL del reactivo de DNS y 0.5 mL de las soluciones estándares de $C_6H_{12}O_6$ en tubos de ensayo etiquetados con tapa rosca de 20 mL.
4. Luego se llevaron a agitación y después a calentamiento en un vaso de precipitado con agua a 100°C durante 5 min. Transcurrido este tiempo se dejaron enfriar en un baño con hielo para detener la reacción.
5. Al final se adicionaron a los tubos de ensaye 3 mL de agua destilada para aforarlo a 5 mL.

C. Preparación de las muestras

Para cada muestra se prepararon soluciones a una concentración de 1 g/L de *C. esculenta*. Para ello:

1. Se pesaron 0.1 g de muestra con y sin HEBM, que fueron agregadas cada una en un matraz Erlenmeyer con tapa rosca de 50 mL etiquetados.
2. A las muestras anteriores se les agrego 20 mL de agua destilada con una micropipeta de 10 mL.

3. Posteriormente en tubos de ensaye con tapa rosca de 10 mL etiquetados, se agregaron 0.5 mL de las soluciones de cada muestra (0, 5, 10, 20, 30 y 40 min HEBM) y 1.5 mL del reactivo de DNS.
4. Luego se llevaron a agitación y después a calentamiento en un vaso de precipitado con agua a 100°C durante 5 min.
5. Transcurrido este tiempo se dejaron enfriar en un baño con hielo para detener la reacción.
6. Después se adicionaron a los tubos de ensayo 3 mL de agua destilada para aforarlo a 5 mL.
7. Las soluciones estándares de $C_6H_{12}O_6$ y de las muestras se llevaron a agitación.
8. Finalmente se midió la absorbancia de cada uno a una longitud de onda de 540 nm mediante un espectrofotómetro de ultravioleta visible (UV-Vis) (Marca PerkinElmer, modelo Lambda 25). Las mediciones para esta técnica se realizaron por triplicado.

7.4 Caracterización fisicoquímica de *Colocasia esculenta*

7.4.1 Espectrometría infrarroja (FT-IR-ATR)

Esta técnica se utilizó para la identificación de grupos funcionales de *C. esculenta*, y de esta manera identificar cambios estructurales antes y después de la HEBM. Para ello se utilizó un espectrómetro de infrarrojo con transformada de Fourier e interferómetro con reflectancia total atenuada (FT-IR-ATR) (marca PerkinElmer, modelo Spectrum 100). A las distintas muestras de *C. esculenta* con y sin HEBM se analizaron en el infrarrojo medio (4000-600 cm^{-1}). Se utilizó 0.1 g de muestra para su análisis, y como referencia se usó almidón nativo de malanga.

7.4.2 Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA) es una técnica cualitativa que indica la pérdida de masa con respecto al aumento gradual de la temperatura. Por lo que esta técnica se empleó para evaluar los cambios durante la descomposición térmica de *C. esculenta*

utilizando un analizador simultáneo (marca Perkin-Elmer, modelo STA 6000). Para cada análisis se utilizó entre 10-15 mg de muestra con y sin HEBM, y como referencia se usó almidón nativo de malanga. Las condiciones de medición se realizaron en cuatro etapas de la siguiente manera: 1) temperatura a 30°C durante 1 min, 2) calentamiento de 30 a 700°C a una velocidad de 10°C/min, 3) temperatura a 700°C durante 1 min, y 4) enfriamiento de 700°C a 30°C a una velocidad de 50°C/min. Las cuatro etapas anteriores se realizan bajo una atmosfera inerte de nitrógeno (N₂) con un flujo continuo de 20 mL/min.

7.5 Fermentación

7.5.1 Microorganismo

La cepa de *Escherichia coli* utilizada en este trabajo se tenía conservada en congelación a -14°C con glicerol al 50 % en el laboratorio de Biorreactores, ubicado en el Centro de Investigaciones Científicas (CIC) de la Universidad del Papaloapan, campus Tuxtepec, Oaxaca. Para su uso, la cepa se reactivó bajo condiciones estériles en una campana de flujo laminar con 125 mL de medio Luria-Bertani (Lysogeny Broth, LB) esterilizando en una autoclave (marca ECOSHEL, modelo CVQ-B50L). Este medio está compuesto de 10 g/L peptona de caseína, 5 g/L extracto de levadura y 5 g/L cloruro de sodio, ajustado a pH = 7 con NaOH 1N utilizando un medidor de pH / mV (marca SCIENCE MED, modelo SM-25CW). Posteriormente se incubó a 37 °C en una cámara frigorífica vertical (marca ThermoFisher Scientific, modelo estándar) durante 12 horas. Posteriormente se colectó el medio de cultivo y se depositó en tubos de 50 mL, para poderlo centrifugar a 5500 rpm durante 15 min (centrifuga marca Thermo Scientific, modelo Megafuge 16R). Después, bajo condiciones estériles, se decantó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con 2 mL de agua destilada estéril y 2 mL glicerol al 50 %. Para conservar nuevamente la cepa se colocó 1 mL del sedimento resuspendido en tubos eppendorf y se guardó a -14°C para su posterior uso.

7.5.2 Inóculo

Para la preparación del inóculo, en 100 mL de medio LB se le agregó 1 mL de *E. coli* (conservado en glicerol) y se incubó a 37 °C durante 12h.

7.5.3 Medio de cultivo

Para llevar a cabo la fermentación oscura empleando *E. coli*, se eligió un medio de cultivo que solo contiene sales minerales y una sola fuente de carbono, de tal manera que se facilite la evaluación del crecimiento debido a la presencia de un solo sustrato limitante. En el medio de cultivo utilizado como referencia se usó glucosa como fuente de carbono (Tabla 3).

Tabla 3. Composición del medio de glucosa (Poladyan *et al.*, 2020).

Componente		g/L	Función
C ₆ H ₁₂ O ₆	Glucosa	10	Fuente de carbono
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potasio dibásico	2	Amortiguador de pH
NaCl	Cloruro de sodio	5	Regulador osmótico
Tipo I	Peptona de caseína	20	Fuente de nitrógeno

En el medio de cultivo con *C. esculenta* modificada por HEBM como fuente de carbono se utilizó únicamente la muestra que presento el mayor contenido de azúcares reductores. La cantidad de *C. esculenta* modificada a utilizar en el medio de cultivo se calculó con base en su concentración de azúcares reductores obtenidos por el método DNS y que el medio de cultivo propuesto utiliza 10 g/L de fuente de carbono con C₆H₁₂O₆. Una vez teniendo la fuente de carbono, el medio de cultivo se completó con los reactivos de la Tabla 3.

7.5.4 Fermentación oscura

La fermentación oscura de *E. coli*, tanto para glucosa como para la *C. esculenta* modificada, se realizó en frascos color ámbar de 300 mL. A los frascos se les colocó una

barra de agitación magnética y se cerraron con septas de goma. Para cada fermentación se agregaron 245 mL de medio de cultivo de glucosa (Tabla 3) y *C. esculenta* estériles, aforando cada uno a 250 mL con 5 mL del inóculo del medio LB en un ambiente estéril utilizando una campana de flujo laminar horizontal. Después los frascos se colocaron en una parrilla con agitación y se controló su temperatura a 37°C con agitación constante. Para ello se implementó un sistema que permitiera medir el volumen de gases que se produjeran durante la fermentación (Figura 7 a), y otro que almacenara los gases (Figura 7 b). Se tomaron muestras de 2.5 mL del medio de fermentación a cada hora durante 8 h.

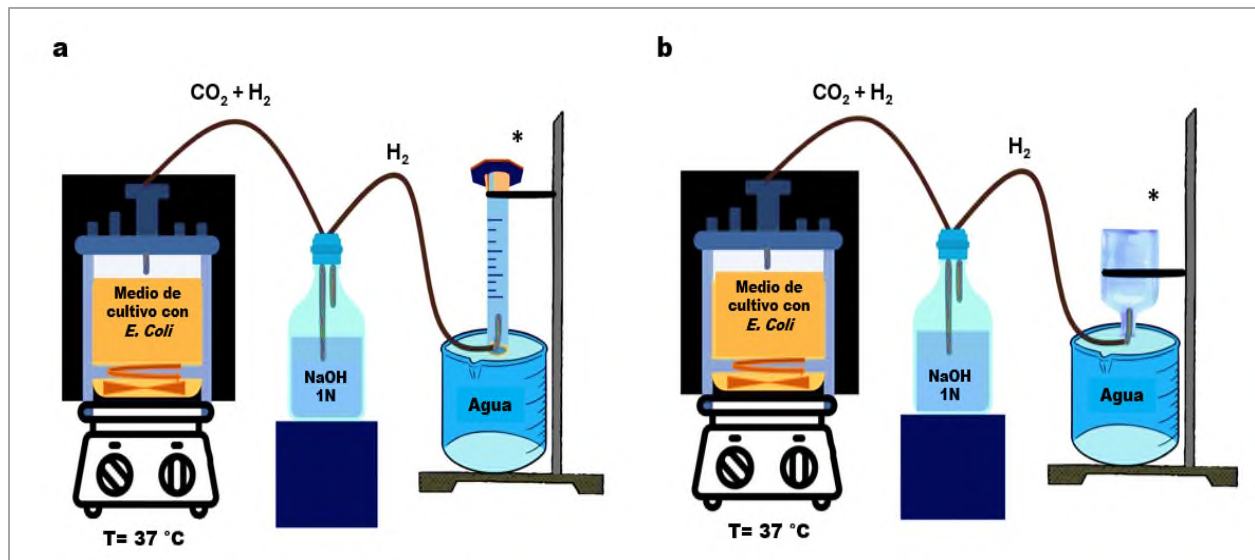


Figura 7. Sistemas de almacenamiento del H₂ obtenido de la fermentación oscura con *E. coli*.
*La probeta y el frasco están dentro del contenedor, ambos llenos con agua.

A las muestras del medio de fermentación tomadas a cada hora se les realizaron las siguientes mediciones:

- **pH:** La mayoría de las especies bacterianas disminuyen el pH de su medio de cultivo con el tiempo, incluida *E. coli*. Debido a la producción de ácidos se puede llegar a limitar el crecimiento máximo y la viabilidad del cultivo. Por lo que es importante llevar un control continuo del pH con la finalidad de observar cómo se comporta el crecimiento de esta bacteria con los cambios de pH.

- **Densidad óptica (OD):** La medición de la OD a 600 nm es una forma sencilla de medir el crecimiento en el cultivo bacteriano. La densidad óptica mide el grado de dispersión de la luz causado por las bacterias de un cultivo; cuantas más bacterias haya, más se dispersará la luz.
- **Potencial óxido reducción (ORP):** El potencial redox del medio disminuye durante el crecimiento de *E. coli*. La forma de la curva de potencial redox es característica del tipo de microorganismo. La velocidad del cambio (dN/dt, incremento del número de células por unidad de tiempo) es proporcional a la concentración de las células vivas.

7.6 Determinación de H₂ por cromatografía de gases (GC-TCD)

La determinación del H₂ obtenido de la fermentación oscura de *E. coli* se realizó considerando los parámetros de operación del equipo que se muestran en la tabla 4 mediante GC-TCD.

Tabla 4. Condiciones de separación y detección de H₂ (Toonen, 2013; Weijun, 2015; Recuperado de: https://www.restek.com/global/en/chromatogram-detail/GC_MS01136).

<i>Cromatógrafo de gases</i>	Marca Agilent Technologies, modelo 7890A (G3440A)
<i>Flujo</i>	5 mL/min de N ₂
<i>Inyector</i>	Split 10 200 °C
<i>Volumen de inyección</i>	5, 10, 15, 20 y 25 µL (H ₂ puro para la curva de calibración) 15 µL de gas obtenido de la fermentación oscura
<i>Columna</i>	HP-Molesieve (30 m, 0.53 mm d.i., 50 µm film)
<i>Horno de columna</i>	Separación isotérmica, 30 °C
<i>Detector</i>	Detector de conductividad térmica (TCD) 200 °C Flujo de referencia (N ₂) 10.5 mL/min Make up (N ₂) 2 mL/min Polaridad negativa

8. Resultados y discusión

8.1 Secado de *Colocasia esculenta*

La masa inicial de *C. esculenta* fue de 5.320 g y al final del proceso de secado su masa fue de 1.115 g. Debido a que la materia orgánica está constituida mayoritariamente de agua, se puede establecer que la masa total (m_h) del material es igual al de su masa seca (m_s). Considerando lo anterior se determinó el contenido de humedad ($\%C_h$) de la muestra a partir de la siguiente ecuación:

$$\%C_h = \left(\frac{m_h - m_s}{m_h} \right) \times 100 \% \quad \text{Ec. 2}$$

Aplicando la ecuación 2 se determinó que el contenido de humedad de la muestra es de 79.04%. Aunque el contenido de humedad puede variar debido a diversos factores como la madurez de la malanga, temporada de cosecha, etc., el porcentaje obtenido en este trabajo se aproxima a lo reportado en la literatura (Morales-Toledo, 2018).

8.2 Molienda mecánica de alta energía (HEBM) de *Colocasia esculenta*.

En la Tabla 5 se describen los cambios macroscópicos en las muestras después de realizar la HEBM (Figura 8).

Tabla 5. Características macroscópicas de *C. esculenta* después de la HEBM.

Características	Descripción
Color	Se observó que <i>C. esculenta</i> presentó un ligero cambio en su coloración pasando de blanco a beige. Esta coloración se fue intensificando conforme aumentó el tiempo de molienda, siendo mayor a los 20, 30 y 40 min (Figura 8).
Homogeneidad	El polvo obtenido después de la HEBM es fino. Sin embargo, durante el proceso de molienda se observó que en los tiempos 20, 30 y 40 min el polvo que se obtiene se adhiere en los tazones.

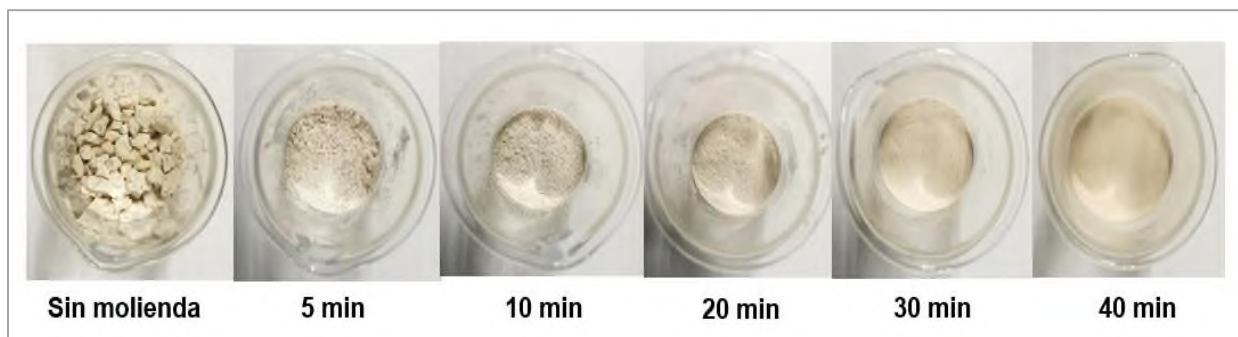


Figura 8. Muestras de *C. esculenta* antes y después de la HEBM.

La temperatura que se alcanza durante el proceso de HEBM podría estar relacionada con los cambios en la intensidad del color *C. esculenta*, considerando que la materia prima contiene carbohidratos. Es decir, conforme aumenta el tiempo de molienda los carbohidratos presentes en las muestras se empiezan a caramelizar. La caramelización es una reacción de oscurecimiento que ocurre cuando los azúcares se calientan por encima de su punto de fusión. Además, se ha descrito que la presencia de azúcares reductores se correlaciona con el grado de oscurecimiento no enzimático que se desarrolla durante el calentamiento (Pritchard & Adam, 1994; Şen & Gökmen, 2022).

8.3 Determinación de azúcares reductores en *Colocasia esculenta*

Después de medir la absorbancia en las soluciones de calibración que contenía dextrosa en el intervalo de concentración de 0.2 a 1 g/L, se elaboró un gráfico de dispersión que mostró una función de regresión lineal (Figura 9) con un excelente factor de correlación ($R^2= 0.9991$). A partir de la ecuación obtenida de la gráfica se calculó la concentración de azúcares reductores de las distintas muestras. La ecuación reajustada para este caso fue la siguiente:

$$C = \frac{Abs - 0.0734}{0.9471} \quad Ec. 3$$

Donde *Abs* es la absorbancia medida (UA) y *C* es la concentración de azúcares reductores en cada muestra (0, 5, 10, 20, 30 y 40 min HEBM) en g/L.

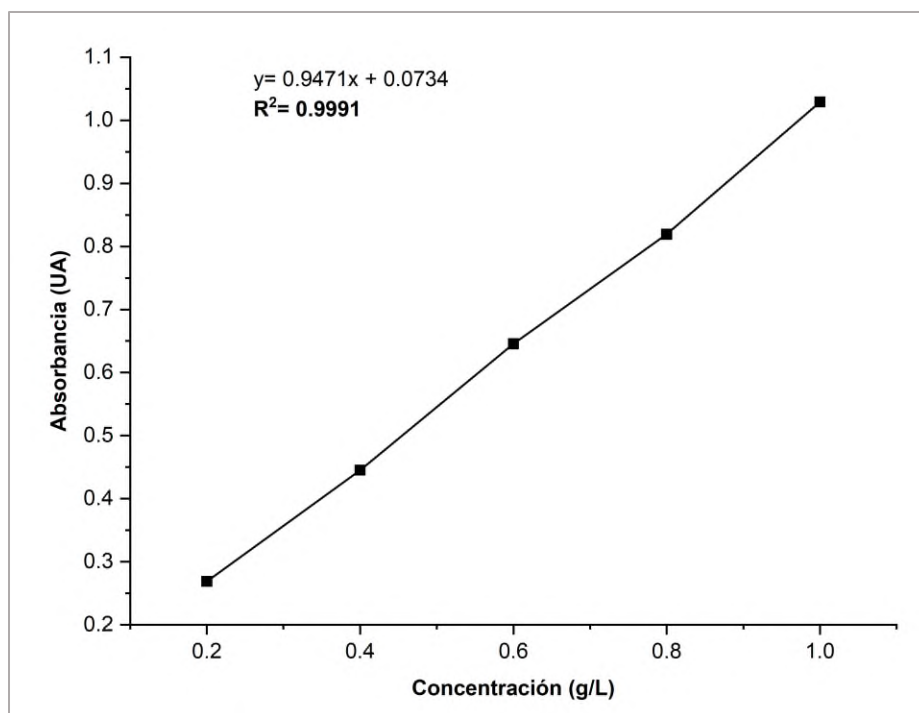


Figura 9. Curva de calibración de glucosa ($C_6H_{12}O_6$) medida a 540 nm.

En la Figura 10 se presentan los resultados de las mediciones de la concentración de azúcares reductores en *C. esculenta* antes y después de la HEBM. En dicho gráfico se observa que en los primeros tiempos de molienda (5 y 10 min) hay un incremento en la concentración de azúcares reductores, alcanzando una concentración máxima a los 10 min de molienda (140.70 mg/g de *C. esculenta*), y disminuye en los tiempos posteriores. Estos resultados concuerdan con lo descrito en la literatura sobre el efecto de la HEBM en la concentración de azúcares reductores de sustratos orgánicos no convencionales (soya, yuca, papa, malanga, betabel, entre otros) (Juarez-Arellano *et al.*, 2021; Martínez-López, 2018; Morales-Toledo, 2018; Navarro-Mtz *et al.*, 2017; Navarro-Mtz *et al.*, 2019; Sosa-Arróniz, 2020). También se ha reportado que el tratamiento de sustratos orgánicos no convencionales por HEBM aumenta aproximadamente tres veces su concentración de los azúcares reductores (Morales-Toledo, 2018; Urzua-Valenzuela, 2017). Lo cual coincide con los resultados obtenidos en este trabajo, al comparar *C. esculenta* sin molienda con el de 10 min de HEBM (Figura 10).

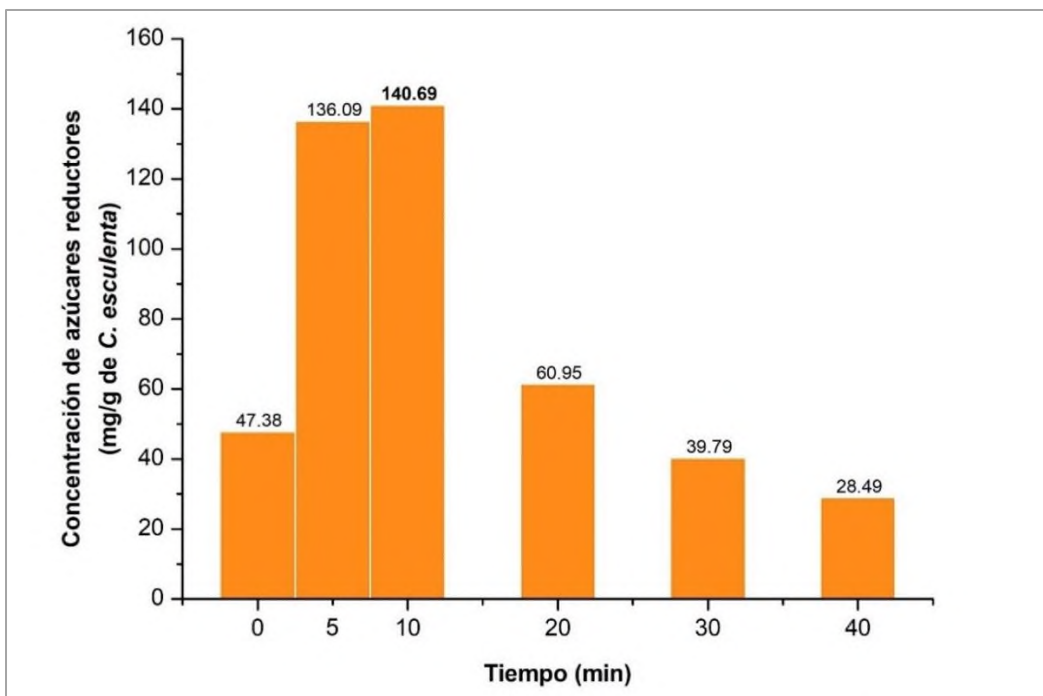


Figura 10. Concentración de azúcares reductores en *C. esculenta* antes y después de la HEBM.

8.4 Caracterización fisicoquímica de *Colocasia esculenta* modificada

8.4.1 Espectroscopía infrarroja (FT-IR-ATR) de *Colocasia esculenta*

De acuerdo con los espectros obtenidos por el espectrofotómetro de IR (Figura 11), *C. esculenta* presenta bandas de absorción características de la glucosa, la cual es la base estructural del almidón (Sánchez-Rivera, 2020). A 3300 cm^{-1} se presenta los enlaces libres inter- e intramoleculares de los grupos hidroxilos (-OH) (Fan *et al.*, 2012; Pozo *et al.*, 2018) (Figura 12 a). La señal a 2930 cm^{-1} , se asocia a los enlaces C-H del anillo de la glucosa, la cual varía conforme a la proporción de amilosa y amilopectina en los almidones. Por ejemplo, el almidón de maíz tiene un 28% de amilosa, mientras que el almidón de papa tiene 20%. Al disminuir la proporción de amilosa da como resultado un aumento en la intensidad máxima de la región C-H y un mayor grado de cristalinidad. (Andrade *et al.*, 2017; Kizil *et al.*, 2002). Los espectros obtenidos de las muestras de *C. esculenta* correspondientes a esta región muestran poca intensidad, lo que significaría que hay mayor proporción de amilosa y un menor grado de cristalinidad (Figura 12 a). Mientras que a 1644 cm^{-1} se encuentra las vibraciones de flexión de los grupos -OH del

agua absorbida en la región amorfa de las moléculas de almidón. Debido a que esta banda está relacionada con la cristalinidad del almidón, las variaciones en la cristalinidad de diferentes almidones pueden afectar a esta banda (Figura 12 b) (Andrade *et al.*, 2017; Dankar *et al.*, 2018; Kizil *et al.*, 2002). Además, el aumento en la amplitud de la banda de absorción de -OH y la intensidad de las vibraciones de flexión del agua se pueden atribuir a cambios en los enlaces de hidrógeno inter- e intramoleculares de las moléculas de almidón (Kumar *et al.*, 2018; Tirado-Gallegos *et al.*, 2016). A 1415 cm^{-1} se encuentran las vibraciones de flexión del metileno (-CH₂-OH) (Figura 12 b). Dentro de la huella dactilar del almidón, que abarca de 1250 a 400 cm^{-1} , se encuentran las vibraciones de los estiramientos C-OH (1046 cm^{-1}), la flexión del enlace C-OH (990 cm^{-1}), la vibración del enlace glucosídico α -1 \rightarrow 4 (C- O- C) (930 cm^{-1}), la deformación del enlace C₁-H (855 cm^{-1}) y el estiramiento de los enlaces C-C del anillo de la glucosa (760 cm^{-1}) (Figura 12 c-d) (Dankar *et al.*, 2018; Fan *et al.*, 2012; Kizil *et al.*, 2002). De acuerdo con lo anterior, los espectros de almidón provenientes de *C. esculenta* tratadas con HEBM concuerdan con lo descrito en la literatura (Morales-Toledo, 2018; Sánchez-Rivera, 2020).

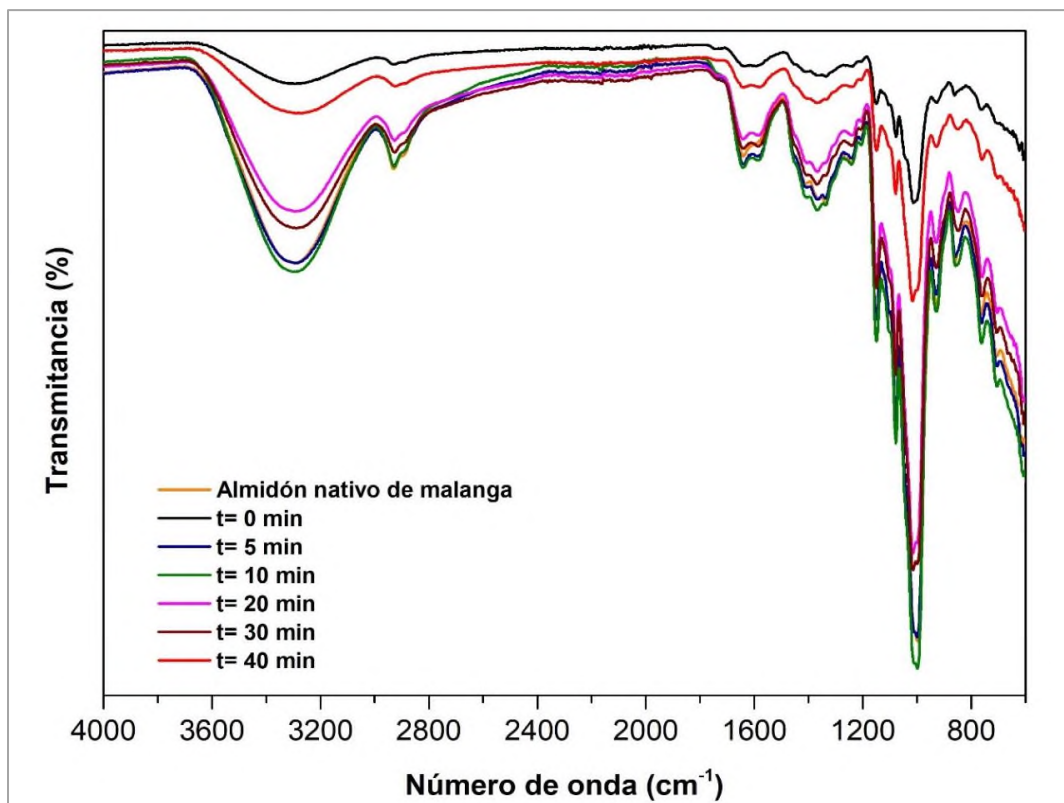


Figura 11. Espectros IR de *C. esculenta* antes y después de la HEBM.

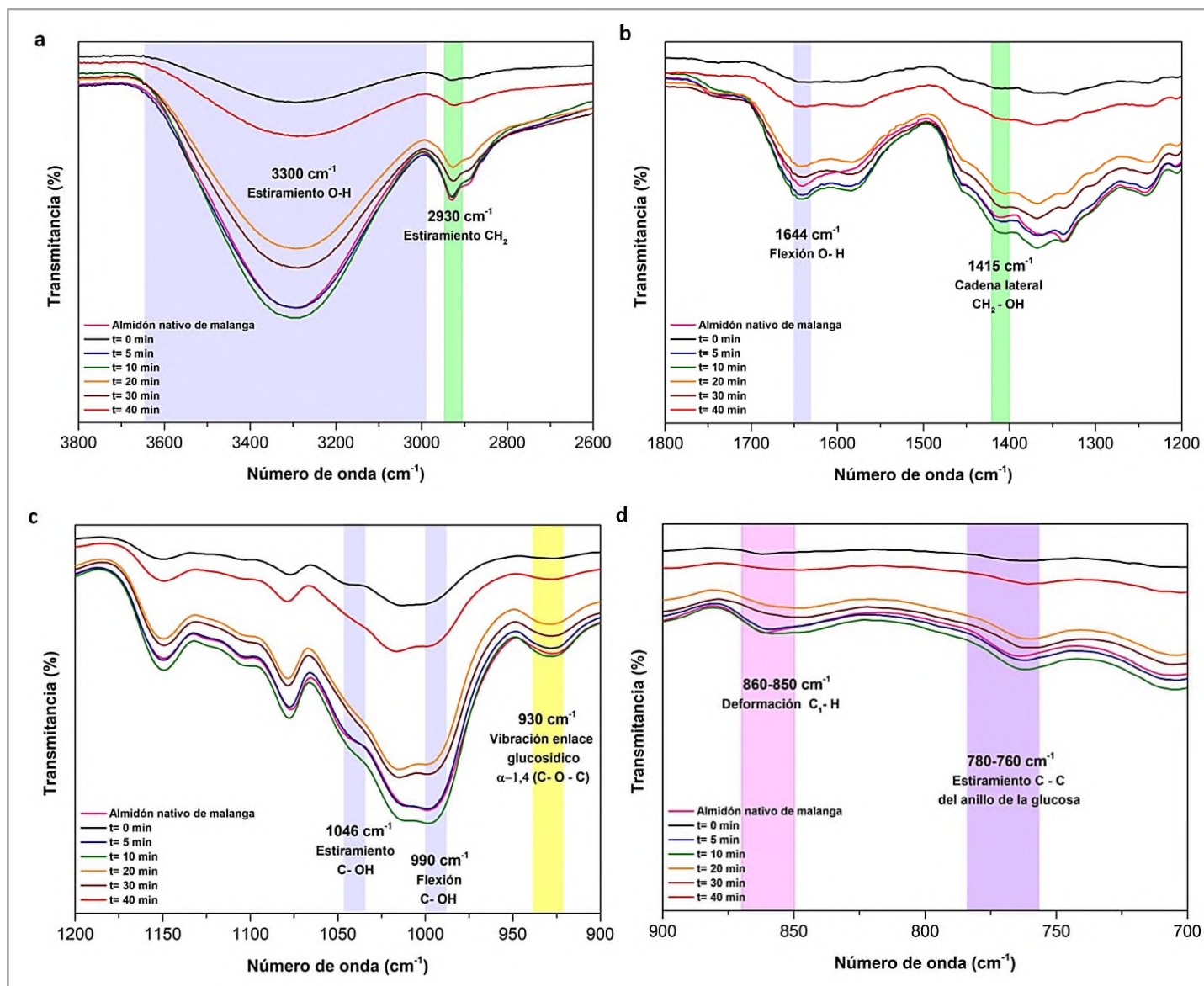


Figura 12. Espectros IR de *C. esculenta* antes y después de la HEBM, ampliados a) 3800-2600 cm⁻¹, b) 1800-1200 cm⁻¹, c) 1200-900 cm⁻¹ y d) 900-700 cm⁻¹.

De acuerdo con lo observado en los espectros de FT-IR-ATR de *C. esculenta* (Figura 12), existen variaciones en las bandas de absorción por efecto de la HEBM, lo que se puede asociar a los cambios estructurales que sufre el almidón durante el proceso. Estos cambios son evidentes a los 10 min de molienda, en donde se observa que los grupos funcionales hidroxilos, enlaces glucosídicos y los enlaces por puentes de hidrógeno intramolecular presentan la mayor absorbancia. Es decir, que la HEBM hace que estos tipos de enlaces estén más expuestos y por lo tanto sean visibles por FTIR.

8.4.2 Análisis termogravimétrico (TGA) de *Colocasia esculenta*

La estabilidad térmica del almidón nativo y de *C. esculenta* se analizó mediante TGA (Figura 13). En los termogramas obtenidos se observó que la descomposición térmica para todas las muestras de *C. esculenta* y el blanco (almidón nativo de malanga) se desarrolla en tres etapas (Figura 13). Esto concuerda con lo reportado en la literatura donde se ha descrito el comportamiento del almidón durante su descomposición térmica. Donde la primera etapa (T= 30-130 °C) corresponde a una reducción de masa atribuida a la pérdida de agua en las muestras (Figura 13 a). El proceso comienza con una rápida deshidratación y descomposición del hidroxilo en los anillos de glucosa para formar las moléculas de agua (Chinnasamy *et al.*, 2022; Guinesi *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2013; Pigłowska *et al.*, 2020). En la segunda etapa (T= 220-350 °C) se presentan los principales procesos de degradación de las macromoléculas del almidón (amilosa y amilopectina) y de los componentes microorgánicos mediante un proceso no oxidativo (pirólisis) (Figura 13 a). En esta etapa se ha reportado que debido a la alta temperatura se producen rupturas de la cadena principal en los enlaces de C-C-H, C-O, y C-C. De acuerdo con la literatura, los principales productos de la descomposición consisten en H₂O, CO, CO₂, acetaldehído, furano y 2-metilfurano (Chinnasamy *et al.*, 2022; Guinesi *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013; Romero-Hernandez *et al.*, 2021). Por último, en la tercera etapa (T= 350-700 °C) se generan reacciones de carbonización, donde se observó que debido a la formación de cenizas o residuos inertes se requiere mayor energía para eliminarlos (Figura 13 a). Se ha reportado que los gases liberados después de la pirólisis del almidón son: H₂O, C=O, CH₄, C₂H₂ y C₂H₄O₂ (Figura 13 a) (Chinnasamy *et al.*, 2022; Guinesi *et al.*, 2006; Romero-Hernandez *et al.*, 2021).

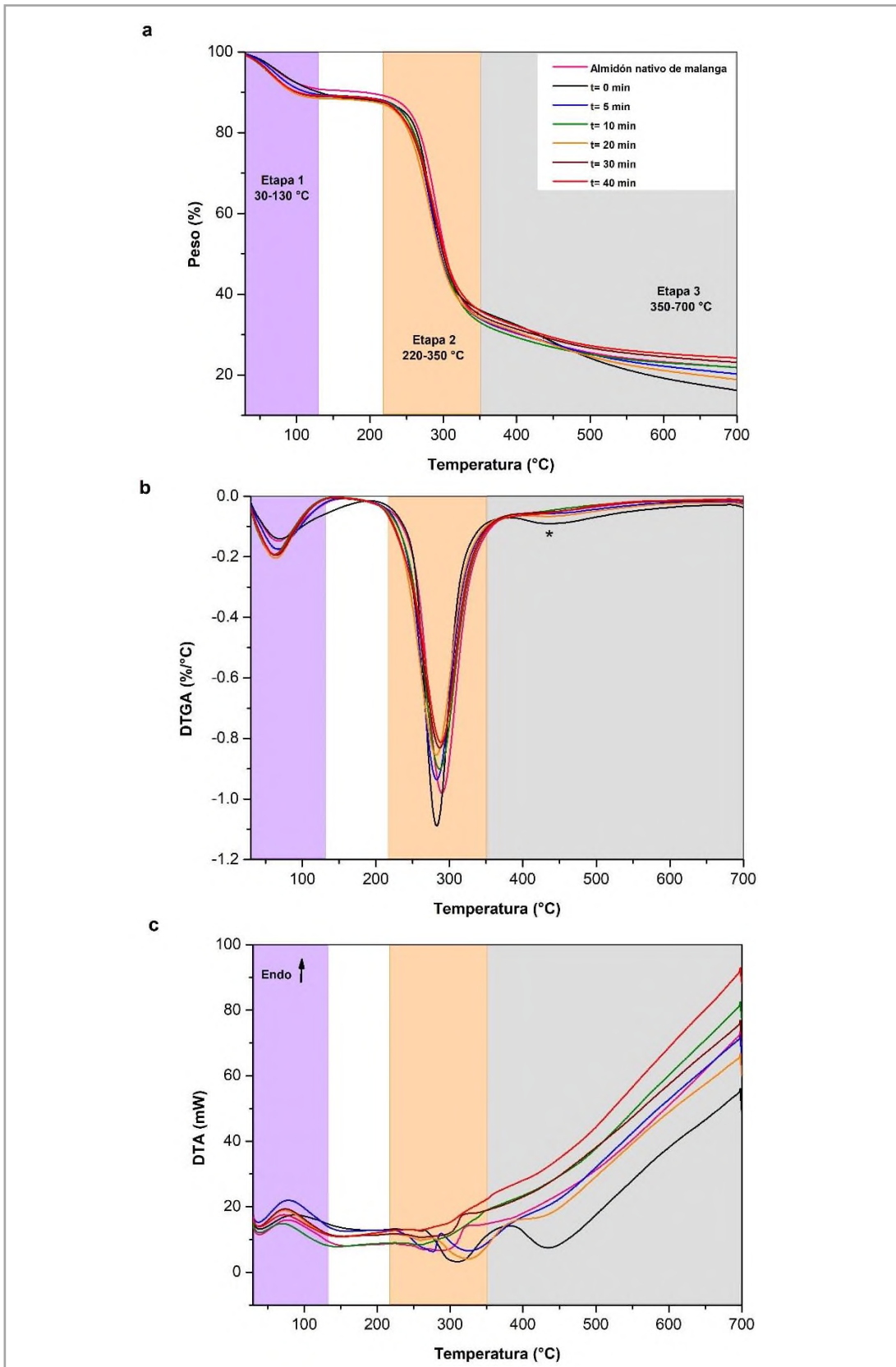


Figura 13. Termogramas de *C. esculenta* antes y después HEBM. a) Análisis termogravimétrico (TGA), b) primera derivada del TGA y c) análisis térmico diferencial (DTA).

La primera derivada de los termogramas discutidos anteriormente se muestran en la Figura 13 b. Con la primera derivada se vuelven más evidentes los cambios asociados a la deshidratación (Etapa 1) y a la descomposición (Etapa 2) de las muestras de *C. esculenta* (Figura 13 b). El almidón nativo de malanga utilizado como referencia en este trabajo tiene un comportamiento similar con las muestras tratadas con HEBM (Figura 13 a-b). Sin embargo, la muestra sin HEBM ($t=0$) presenta una banda a $T>350\text{ }^{\circ}\text{C}$, indicada con un asterisco en la Figura 13 b. Esta señal puede estar asociada con la celulosa presente en la muestra, debido a que la malanga fue tratada por HEBM considerando todo el tubérculo, es decir sin retirar su cáscara (Yu *et al.*, 2017).

Las curvas de DTA muestran un comportamiento similar de las muestras en la etapa de deshidratación (Etapa 1), mientras que en la etapa de descomposición se observó que el proceso es complejo al mostrar un comportamiento aleatorio en las muestras (Etapa 2). Además, se puede observar que la muestra sin HEBM requiere mayor energía para su degradación (Figura 13 c).

Para poder evaluar el efecto de la HEBM en el TGA de *C. esculenta* se procedió al análisis y comparación de los puntos más significativos de los termogramas, como lo son: el área bajo la curva de las Etapas 1 y 2, así como la temperatura, el ancho y valor máximo de la señal de la Etapa 2.

El área de la señal correspondiente a la etapa de deshidratación (Etapa 1) se mantuvo constante independientemente del tiempo de molienda. Cabe mencionar que *C. esculenta* fue previamente deshidratada, por lo que los grupos -OH del almidón de las muestras fueron expuestos durante la HEBM y evaporados al formar H_2O durante su análisis por TGA (Dome *et al.*, 2020; Pigłowska *et al.*, 2020) (Figura 14 a). Por otro lado, se observó una disminución en el valor máximo en la etapa de descomposición (Etapa 2) conforme se incrementa el tiempo de molienda (Figura 14 b). Aunque la temperatura a la cual se lleva a cabo ese proceso es muy similar y los valores se encuentran entre los valores de la muestra $t=0$ ($283\text{ }^{\circ}\text{C}$) y del almidón nativo de malanga ($290\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Figura 14 c).

De acuerdo con la anchura a la altura media de un pico (FWHM, por sus siglas en inglés Full Width at Half Maximum) de la etapa de descomposición se observó que hay cambios

significativos hasta los 10 min de HEBM, y en los tiempos posteriores se mantiene sin cambios (Figura 14 d).

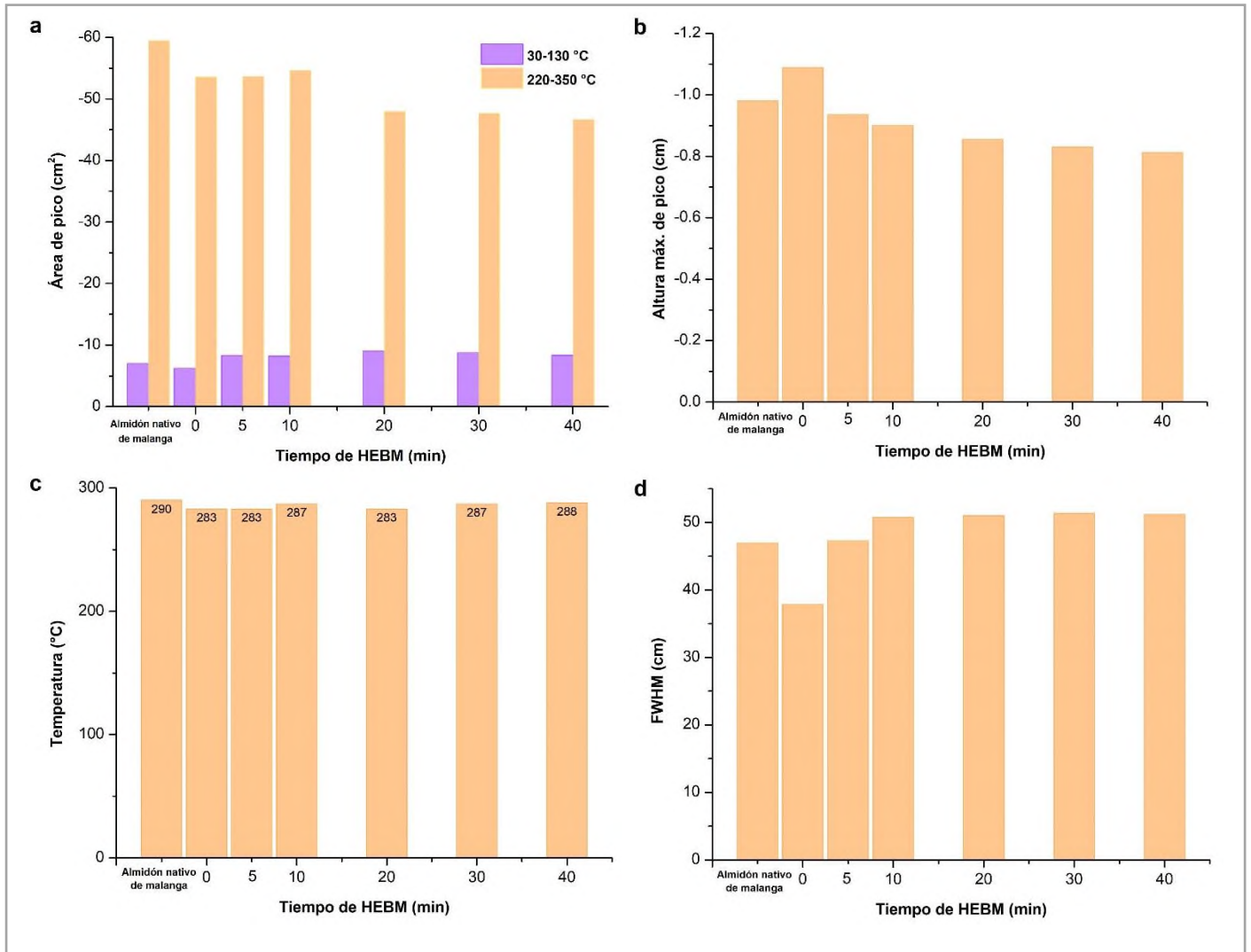


Figura 14. Análisis de los datos obtenidos del TGA de *Colocasia esculenta*.

Con base en el análisis de los puntos más significativos en los termogramas se puede observar que la HEBM genera cambios estructurales en *C. esculenta* que permite que este requiera menor energía para su degradación en comparación con la muestra sin HEBM (t = 0 min).

8.5 Fermentación oscura de *Escherichia coli*

La glucosa ($C_6H_{12}O_6$) es utilizada ampliamente como sustrato para estudiar el proceso de fermentación oscura de *E. coli*; por lo tanto, es conocido el comportamiento de la bacteria durante el proceso de la fermentación y el efecto de los diferentes parámetros (Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2015). Por tanto, para tener valores de nuestro sistema y poderlos comparar con los de referencia se realizaron fermentaciones oscuras de *E. coli* utilizando glucosa como fuente de carbono.

En la Figura 15 se muestran los resultados de la fermentación oscura utilizando glucosa como medio de cultivo. La figura muestra la cinética de crecimiento de *E. coli* por turbidimetría y utilizando el sistema de fermentación de la Figura 7. La cinética presenta las típicas fases de crecimiento: una fase de latencia de 0 a 1 h, una fase exponencial de 1 a 5 h, una fase de transición de 5 a 8 h y una fase estacionaria a partir de las 8 h. Puesto que se ha reportado que no se observa cambio en la pendiente a partir de las 8 h de fermentación se consideró realizar las fermentaciones hasta este tiempo (Morales-Toledo, 2018) (Figura 15). Durante la fermentación se observó un aumento en el potencial oxido reducción (ORP) que indica que se ve favorecido el proceso de oxidación, así como una disminución del pH de 7 hasta 4. Se ha reportado que la disminución del pH durante fermentación oscura de *E. coli* es debido a que su metabolismo genera ácidos: acético, butírico, propiónico, láctico y fórmico. También se ha informado que a partir de $pH < 5$ se induce la enzima formiato-hidrógeno-liasa que cataliza la descomposición del ácido fórmico a H_2 y CO_2 (Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2015; Qu *et al.*, 2022; Wang & Wan, 2009). Aunando a lo anterior, en la Figura 15 se observó que el mayor rendimiento de volumen de gases (Volumen) en el medio de cultivo se presenta a las 5 h de fermentación con $pH < 5$ lo cual concuerda con la literatura.

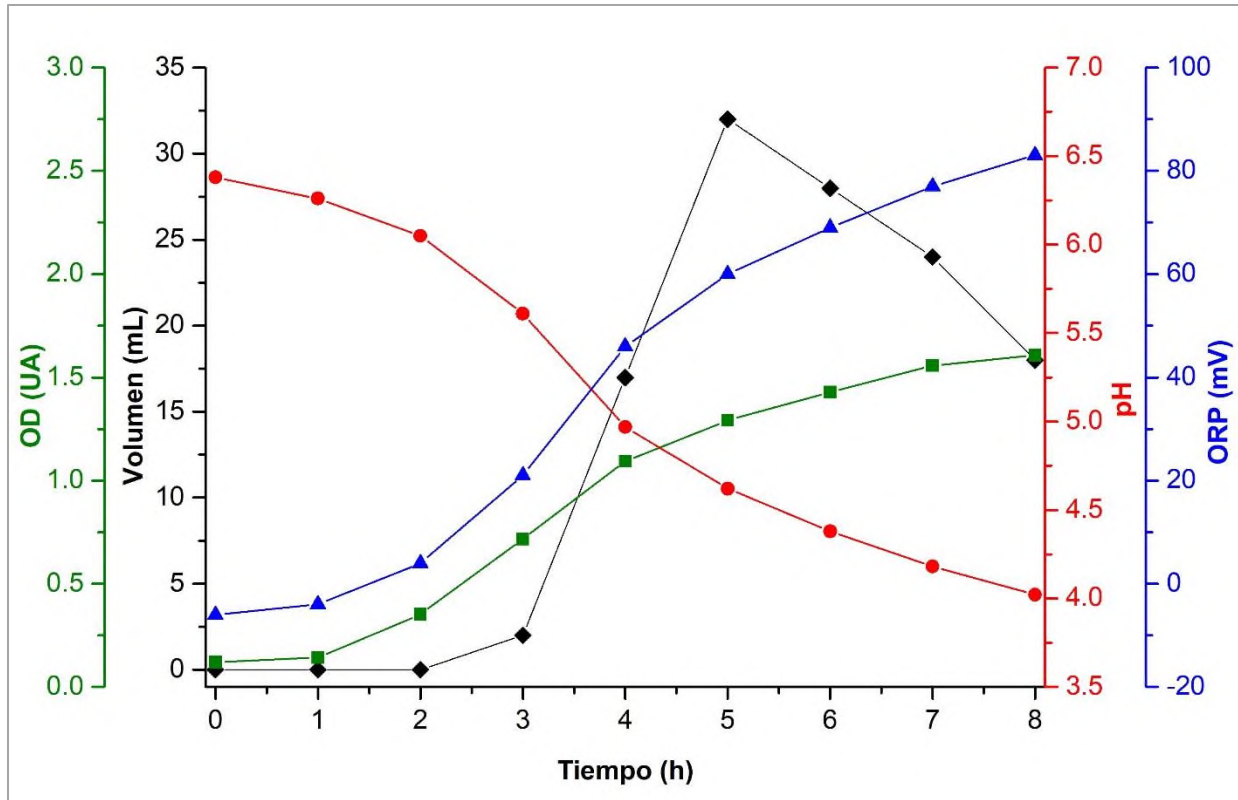


Figura 15. Fermentación oscura de *E. coli* con glucosa ($C_6H_{12}O_6$). Densidad óptica (OD), volumen de gas producido (Volumen) y potencial óxido reducción (ORP).

Una vez estandarizado la fermentación oscura de *E. coli* con glucosa se procedió a realizar la fermentación oscura bajo las mismas condiciones utilizando *C. esculenta* (con 10 min de HEBM) como fuente de carbono (Figura 16). Se selecciono este tiempo de molienda ya que fue donde se presentó la mayor concentración de azúcares reductores. El comportamiento de los resultados en esta fermentación fue muy similar al del sustrato con glucosa. Donde la cinética de crecimiento de *E. coli* por turbidimetría presenta las típicas fases de crecimiento: una fase de latencia de 0 a 1 h, una fase exponencial de 1 a 5 h, una fase de transición de 5 a 8 h y una fase estacionaria a partir de las 8 h (Figura 16). De igual manera se ha reportado que no se observa cambio en la pendiente a partir de las 8 h de fermentación oscura de *E. coli* al utilizar biomásas por lo que se consideró realizar la fermentación hasta este tiempo (Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2015; Morales-Toledo, 2018; Urzua-Valenzuela, 2017).

Al igual que con el uso de glucosa, usando *C. esculenta* también se observó un aumento en el potencial oxido reducción (ORP) así como una disminución del pH de 7 hasta 4.75

durante la fermentación. De acuerdo con lo anterior en la Figura 16 se observó que el mayor rendimiento de volumen de gases (Volumen) en el medio de cultivo se presenta a las 5 h de fermentación con pH<5 lo cual concuerda con la literatura donde se favorece la producción de gases (H₂ y CO₂).

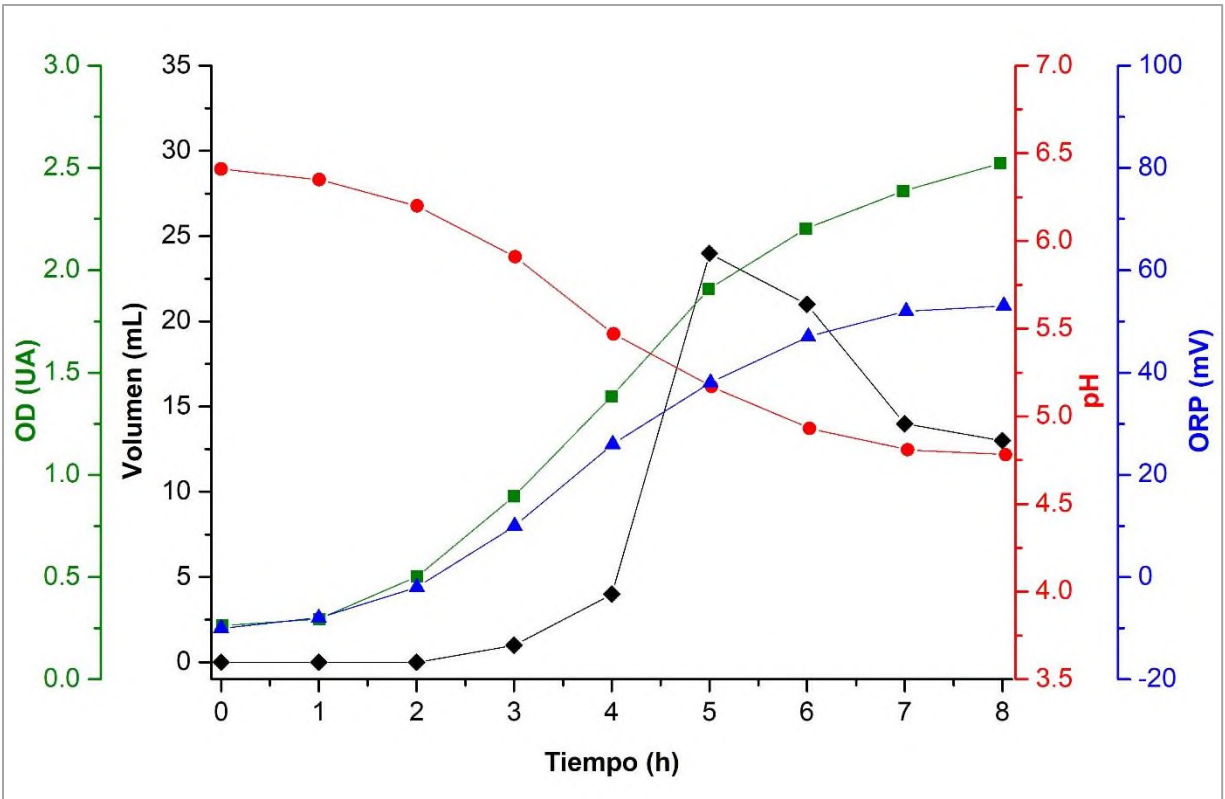


Figura 16. Fermentación oscura de *E. coli* utilizando *C. esculenta*. Densidad óptica (OD), volumen de gas producido (V_{gas}) y potencial óxido reducción (ORP).

Para la determinación de H₂ por GC se realizaron las fermentaciones oscuras de *E. coli* por triplicado tanto para la glucosa como para la *C. esculenta* (con 10 min de HEBM) bajo las mismas condiciones (Figura 17 y 18). Donde se observó el mismo comportamiento del crecimiento de *E. coli* descritos anteriormente con los sustratos de glucosa y *C. esculenta* (Figura 15 y 16). Cabe mencionar que en estos experimentos se utilizó el volumen total de la fermentación oscura (8 h) para la determinación de H₂ por GC-TCD utilizando el sistema que se mostró en la Figura 7 y los parámetros de operación de la Tabla 4.

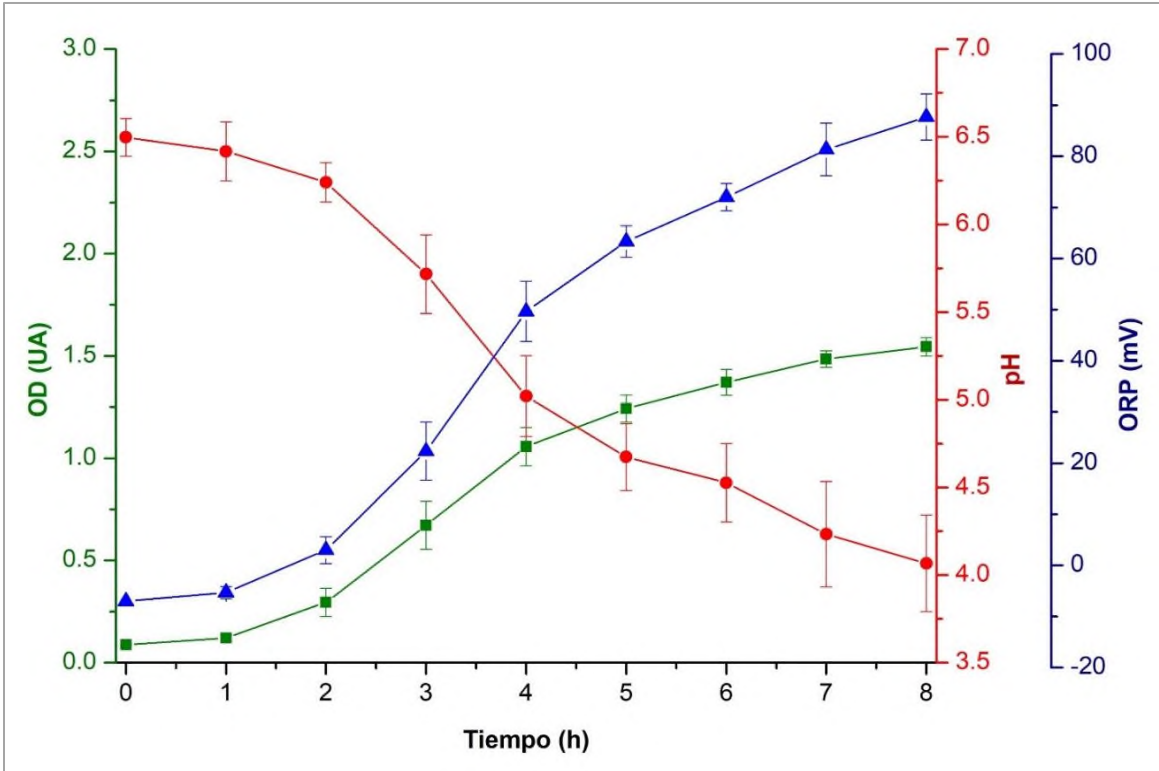


Figura 17. Fermentación oscura de *E. coli* con glucosa ($C_6H_{12}O_6$) para la medición de H_2 .

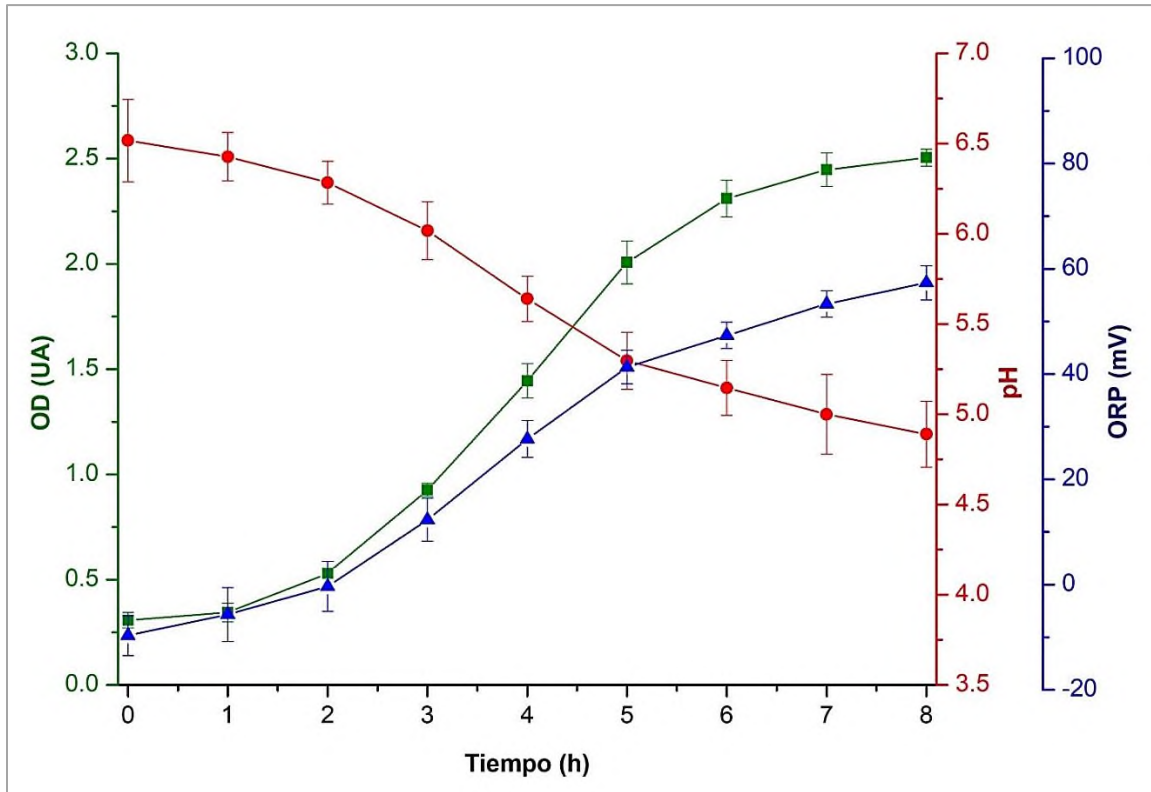


Figura 18. Fermentación oscura de *E. coli* utilizando *C. esculenta* para la medición de H_2 .

8.6. Determinación de H₂ por GC-TCD de la fermentación oscura de *E. coli*.

Para la determinación del H₂ por cromatografía de gases (GC, marca: Agilent Technologies, modelo: 7890A (G3440A)) se realizó un estudio sobre los parámetros de operación para su análisis considerando el tipo de columna y detector a utilizar. Una vez establecidos los parámetros de operación (Tabla 4) se acondicionó el GC para la determinación de H₂ (Figura 19 a). Se realizó el cambio de la columna, ajustando la columna de detector de conductividad térmica (TCD), HP-Molesieve (30 m, 0.53 mm d.i., 50 µm film), dentro del horno del GC (Figura 19 b). Después se elaboró un sistema para almacenar H₂ puro, el cual se utilizó para realizar una curva de calibración (Figura 19 c). Posteriormente se realizó la inyección manual de H₂ puro para verificar el acondicionamiento del GC (Figura 19 d).

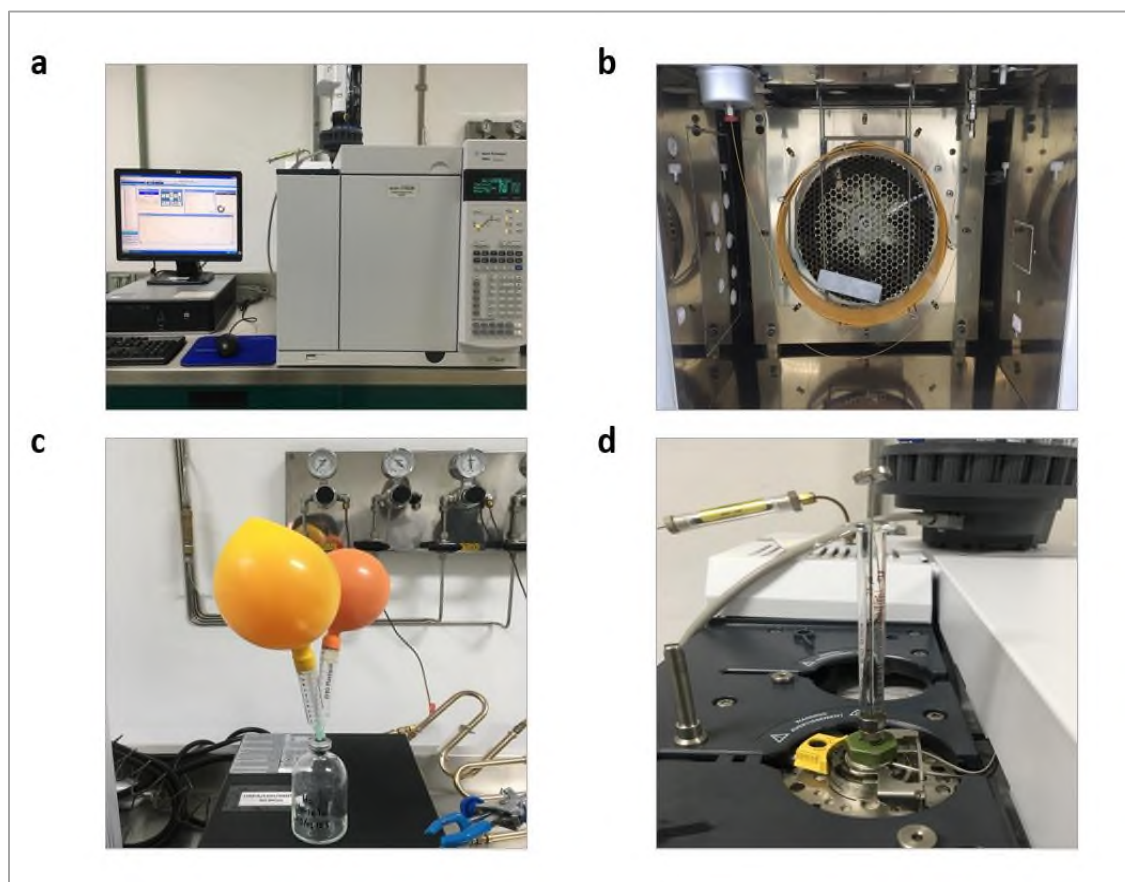


Figura 19. Acondicionamiento del equipo cromatógrafo de gases (GC).

Para la curva de calibración se realizó la inyección manual de H₂ puro con volúmenes de: 5, 10, 15, 20 y 25 µL. Se observó que el tiempo de retención del H₂ puro es de 2 min (Figura 20).

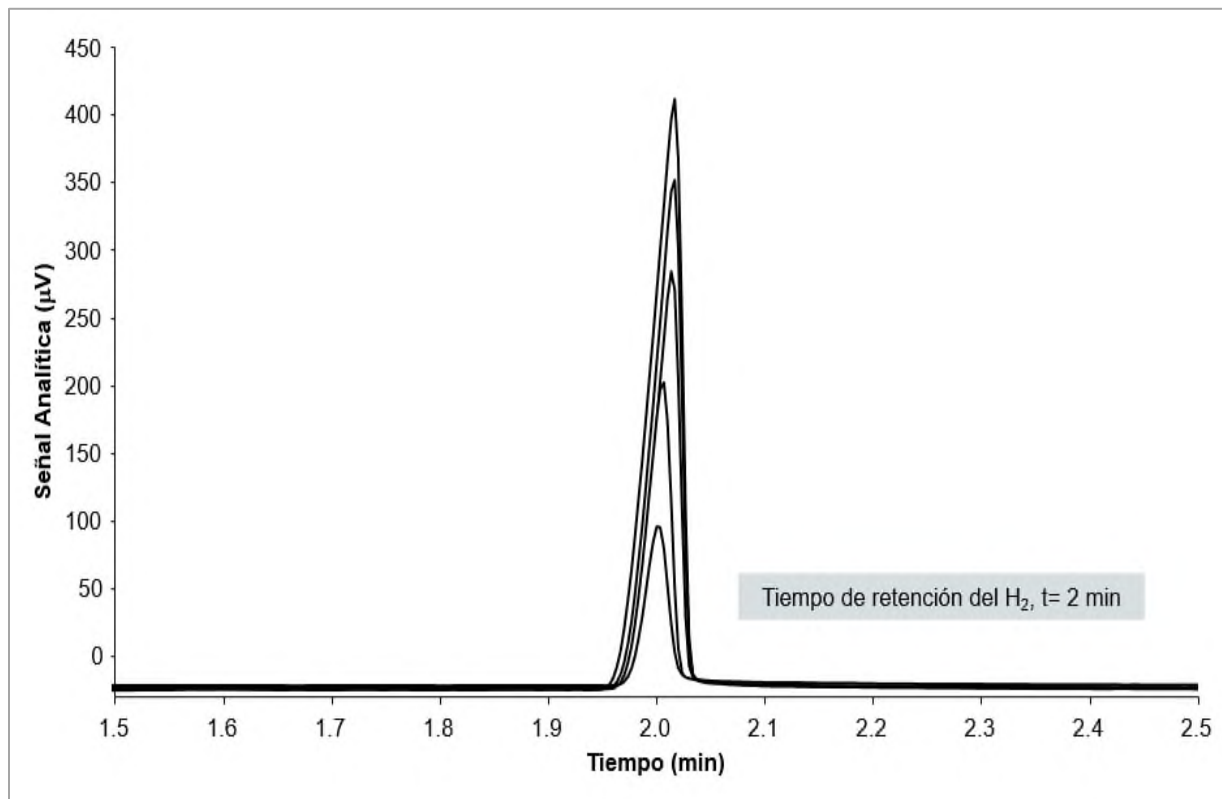


Figura 20. Cromatogramas GC-TCD obtenidos a partir de la inyección de 5, 10, 15, 20 y 25 µL de H₂ puro.

De acuerdo con los datos obtenidos se elaboró un gráfico de dispersión utilizando el área de pico de cada cromatograma correspondiente a los diferentes volúmenes de inyección de H₂ puro. El gráfico, mostró una función de regresión lineal con un excelente factor de correlación ($R_2 = 0.9996$) (Figura 21).

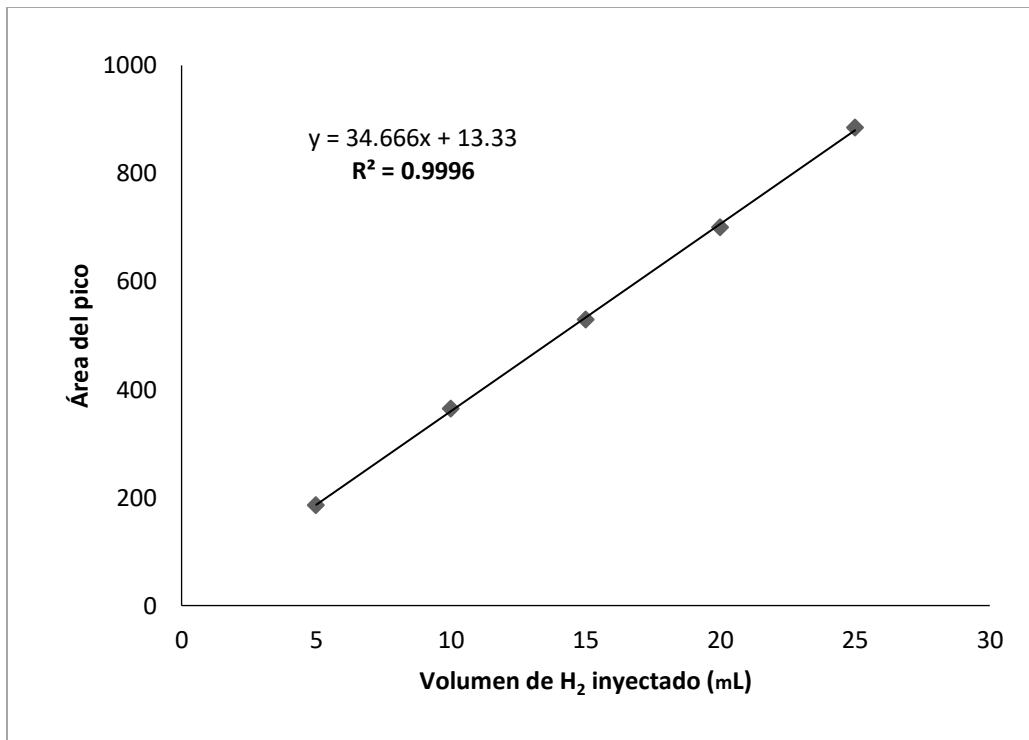


Figura 21. Curva de calibración de H₂ puro (GC-TCD).

De acuerdo con los cromatogramas del gas obtenido de las fermentaciones oscuras con glucosa y *C. esculenta* como sustratos se obtuvo una señal analítica con un tiempo de retención de 2 min en ambos casos con distintas intensidades y áreas de pico. Este tiempo de retención concuerda con el tiempo de retención del H₂ puro, por lo que se concluye que con ambos sustratos se obtiene bio-hidrógeno (Figura 22).

El volumen del bio-H₂ contenido en el volumen total de gas que se obtuvo de las fermentaciones con glucosa y *C. esculenta* se calculó con la siguiente ecuación de regresión lineal:

$$A = m(VH_2) + b \quad \text{Ec.4}$$

Donde: *A* es el área del pico, *m* es la pendiente de la curva de calibración (*m* = 34.66), *VH₂* es el volumen de H₂ en cada muestra, y *b* es la ordenada en el origen de la curva de calibración (*b* = 13.33) (Figura 21).

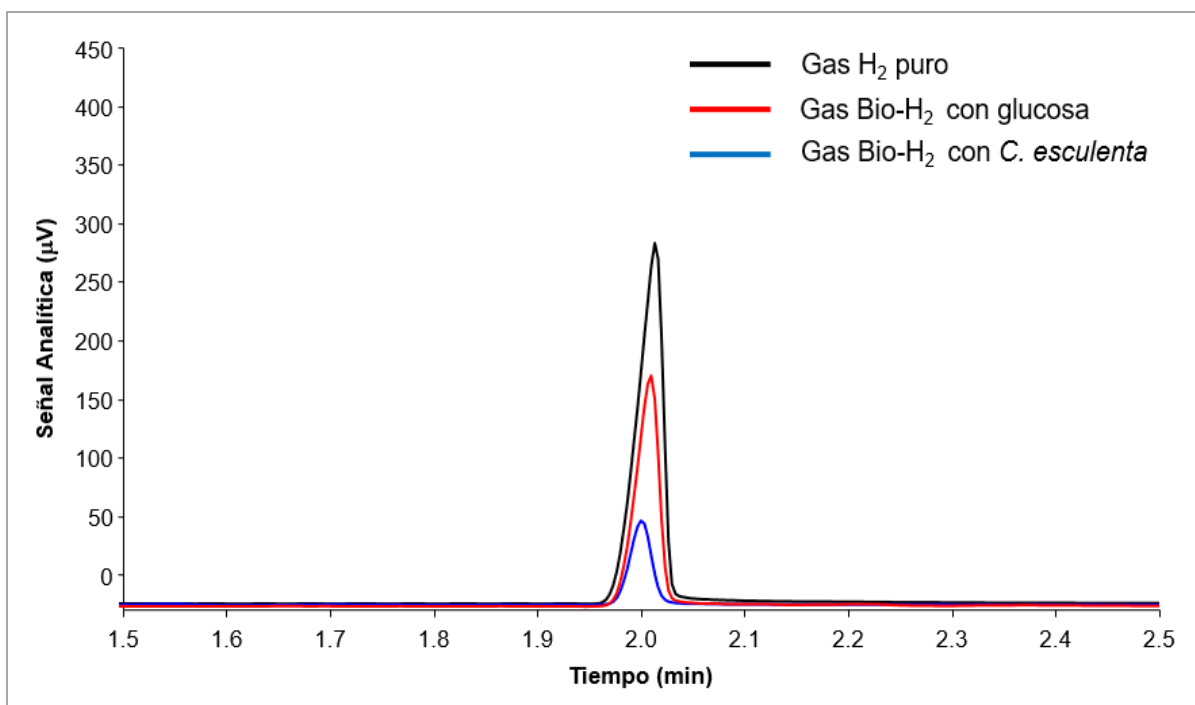


Figura 22. Cromatogramas GC-TCD obtenidos de la inyección de 15 μL de: H_2 puro (negro), bio- H_2 obtenido a partir de glucosa (rojo) y bio- H_2 obtenido a partir de *C. esculenta* (azul).

Los resultados obtenidos de los volúmenes de bio- H_2 se muestran en la Tabla 6 para glucosa y en la Tabla 7 para *C. esculenta*. Toda medición y fermentación se realizó por triplicado.

Tabla 6. Volumen de bio- H_2 de la fermentación oscura con glucosa.

Glucosa			
	V_{gas} (mL)	Área de pico (cm^2)	V de H_2 (μL)
V_{inj} : 15 μL	83	270.31	7.41
	96	309.89	8.55
	111	325.90	9.18
Promedio	96.66	302.03	8.38

Tabla 7. Volumen de bio-H₂ de la fermentación oscura con *C. esculenta*.

<i>Colocasia esculenta</i> (Malanga taro)			
V _{inj} : 15 µL	V _{gas} (mL)	Área de pico (cm ²)	V de H ₂ (µL)
	69	88.78	2.17
	75	106.53	2.68
	77	169.6	4.50
Promedio	73.66	121.63	3.11

Tomando como referencia el volumen de inyección (V_{inj}) de 15 µL al GC del gas producido durante la fermentación oscura utilizando glucosa se obtuvo que el 55.86 % corresponde a bio-H₂. Mientras que solo el 20.73 % es obtenido cuando *C. esculenta* es utilizada. El rendimiento en la producción de bio-H₂ reportado en la literatura es muy variante y es totalmente dependiente del tipo de biomasa utilizada. Además, este rendimiento también se ve afectado por las variaciones en las distintas condiciones de fermentación, el uso de un microorganismo modificado para favorecer la producción de H₂, así como el tratamiento de la biomasa al utilizarlo como sustrato (Tabla 8). Como se puede observar en la Tabla 8 los rendimientos de bio-H₂ obtenido en este trabajo son muy bajos y esto puede estar relacionado con lo mencionado anteriormente. Aunque en este estudio es importante tener en cuenta además el tiempo de fermentación, ya que como se puede observar en el caso de la glucosa el rendimiento es muy bajo con respecto a lo reportado en la literatura donde los tiempos de fermentación duran mucho más tiempo. Mientras que para *C. esculenta*, además de considerar el tiempo de fermentación es importante considerar el tratamiento que se le realizó. A pesar de que la HEBM si genera un cambio significativo en *C. esculenta* este no lo hace en su totalidad. Es decir, no hay disponibilidad de todos los azúcares reductores presentes en *C. esculenta* por lo que la bacteria no asimila todo el sustrato.

Sin embargo, el método utilizado en este trabajo es de bajo costo, de menor tiempo y menos nocivo para el medio ambiente con respecto a otros, lo que hace que la metodología presentada en este trabajo sea una buena alternativa para la producción de bio-H₂.

Tabla 8. Comparación del rendimiento de bio-H₂ obtenido por fermentación oscura con diferentes sustratos (Morales-Toledo, 2018).

Microorganismo	Sustrato	Rendimiento (mol H ₂ /mol de glucosa)
* <i>E. coli</i>	Glucosa.	0.17
<i>E. coli</i> HD701	Melaza hidrolizada con ácido.	0.45
<i>E. coli</i> HD701	Residuos de almidón de papa hidrolizado con ácido.	0.44
** <i>E. coli</i>	Glucosa.	0.0029
** <i>E. coli</i>	<i>Colocasia esculenta</i> .	0.0011

* Cepa parental

** Resultados obtenidos del presente trabajo.

9. Conclusión

El tratamiento de *C. esculenta* con HEBM permitió obtener mayor cantidad de azúcares reductores con 10 min de molienda de acuerdo con el método DNS.

El uso de *C. esculenta* como sustrato de la fermentación oscura de *E. coli* fue factible para su crecimiento.

Se logró estandarizar una técnica para la determinación del hidrógeno obtenido de la fermentación oscura de *E. coli* con *C. esculenta* por GC-TCD.

Se obtuvo gas bio-hidrógeno mediante la fermentación oscura con *E. coli* utilizando como fuente de carbono *C. esculenta* tratada con HEBM.

10. Perspectivas del trabajo

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo se proponen las siguientes perspectivas:

- a) Esta metodología se puede considerar para evaluar otros sustratos orgánicos no convencionales en la producción de bio-hidrógeno.
- b) Determinar que productos se forman en la fermentación oscura de *E. coli* con *C. esculenta* para su aprovechamiento.
- c) Estudiar la cinética de las reacciones que ocurren durante la fermentación oscura utilizando *C. esculenta*.
- d) Optimizar los parámetros (como pH y temperatura) de la fermentación oscura para favorecer la producción de bio-hidrógeno con distintos sustratos orgánicos no convencionales.
- e) Estudiar la producción de bio-hidrógeno con respecto a la enzima formiato-hidrógeno-liasa responsable de su producción con diferentes sustratos no convencionales.

11. Referencias bibliográficas

- Alcázar-Alay, S.C., & Meireles A., M.A. (2015). Physicochemical properties, modifications and applications of starches from different botanical sources. *Food Science and Technology*, 35(2), 215–236. doi:10.1590/1678-457x.6749
- Andrade, L.A., Alves Barbosa, N., Pereira, J. (2017). Extraction and properties of starches from the nontraditional vegetables Yam and Taro. *Polímeros*, 27(2), 151-157. doi: <https://doi.org/10.1590/0104-1428.04216>
- Argun, H. & Kargi, F. (2011). Biohydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview. *International Journal of Hydrogen Energy*. 36, 7443-7459. doi: 10.1016/j.ijhydene.2011.03.116
- Balat, H. & Kirtay, E. (2010). Hydrogen from biomass e present scenario and future prospects. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 7416-7426. doi: 10.1016/j.ijhydene.2010.04.137
- Balat, M., & Ayar, G. (2005). Biomass energy in the world, use of biomass and potential trends. *Energy Sources*, 27, 931–940. <https://doi.org/10.1080/00908310490449045>
- Barakat, A., Mayer-Laigle, C., Solhy, A., Arancon D., R.A., de Vries, H., Luque, R. (2014). Mechanical pretreatments of lignocellulosic biomass: towards facile and environmentally sound technologies for biofuels production. *Royal Society of Chemistry Advances*, 4, 48109–48127. doi:10.1039/c4ra07568d
- Bastidas-Oyanedel, J.-R., Bonk, F., Thomsen, M. H., Schmidt, J. E. (2015). Dark fermentation biorefinery in the present and future (bio)chemical industry. *Rev Environ Sci Biotechnol*, 14(3), 473-498. doi: 10.1007/s11157-015-9369-3
- Burgos M., L.J. 2020. Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de piña con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico. *Revista de Investigación*, 13(1): 57-66. doi: <https://doi.org/10.29097/23461098.308>
- Calleja-Viveros, E., Esperón-Rojas, A.A., Pulido-Herrera, V., Palmeros-Exsome, C., Quintero-Pereda, S., González-Ortega, L.A. (2021). Desarrollo de un puré instantáneo a base de malanga. *UVserva*, 11, 146–156. doi: <https://doi.org/10.25009/uvs.v0i11.2762>
- Chang, R. & García, M. (2006). Principios esenciales de Química General. Mc Graw Hill. 4ª Edición.
- Chinnasamy, G., Dekeba, K., Sundramurthy, P., V., Dereje, B. (2022) Physicochemical properties of tef starch: morphological, thermal, thermogravimetric, and pasting properties, *International Journal of Food Properties*, 25:1, 1668-1682. doi: 10.1080/10942912.2022.2098973

- Chong, M.L., Sabaratnan, V., Shirai Y., Ali H., M. (2009). Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 3277–3287. doi: 10.1016/j.ijhydene.2009.02.010
- Dangkulwanich, M., Kongnithigarn, K., & Aurnoppakhun, N. (2018). Colorimetric Measurements of Amylase Activity: Improved Accuracy and Efficiency with a Smartphone. *Journal of Chemical Education*, 95(1), 141–145. doi: 10.1021/acs.jchemed.7b00468
- Dankar, I., Haddarah, A., Omar, F.E.L., Pujolà, M., Sepulcre, F. (2018). Characterization of food additive-potato starch complexes by FTIR and X-ray diffraction. *Food Chemistry*. doi: [https://doi.org/ 10.1016/j.foodchem.2018.03.138](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.138)
- Dome, K., Podgorbunskikh, E., Bychkov, A., Lomovsky, O. (2020). Changes in the crystallinity degree of starch having different types of crystal structure after mechanical pretreatment. *Polymers*, 12, 641. doi:10.3390/polym12030641
- Fan, D., Ma, W., Wang, L., Huang, J., Zhao, J., Zhang, H., Chen, W. (2012). Determination of structural changes in microwaved rice starch using Fourier transform infrared and Raman spectroscopy. *Starch/Stärke*, 64(8), 1–9. doi:10.1002/star.201100200
- Fan, L., Tu, Z., Hwa C., S. (2021). Recent development of hydrogen and fuel cell technologies: A review. *Energy Reports*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.egy.2021.08.003>.
- Förster H., A. & Gescher, J. (2014). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of mixed-acid fermentation end products. *Frontiers in Bioengineering Biotechnology*, 2(16), 1-12. doi: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00016>
- Fritsch. (2007). Operating Manual Translation of the original. *Fritsch: German: Fritsch GmbH Milling*. http://www.uel.br/laboratorios/filmat/pages/arquivos/equipamentos/manual_moinho%20de%20bolas.pdf
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., N. L. Lens, P., Esposito, G. (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Applied Energy*, 144, 73-95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.045>
- Gopalakrishnan, B., Khanna, N., Das, D. (2019). Dark-Fermentative Biohydrogen Production. *Biohydrogen*, 79-122. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64203-5.00004-6>
- Graetz, J. (2009). New approaches to hydrogen storage. *Chemical Society Reviews*, 38, 73–82. doi: 10.1039/b718842k
- Guinesi, L. S., L. da Róz, A., Corradini, E., C. Mattoso, L.E., Teixeira, E. de M., A. da S. Curvelo, A. (2006). Kinetics of thermal degradation applied to starches from different

botanical origins by non-isothermal procedures. *Thermochimica, Acta* 447, 190–196. doi: 10.1016/j.tca.2006.06.002

Hassan, S.H. & Morsy, F.M. (2015). Feasibility of installing and maintaining anaerobiosis using *Escherichia coli* HD701 as a facultative anaerobe for hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 from various carbohydrates. *Enzyme and Microbial Technology*, 81, 56–62. doi: 10.1016/j.enzmictec.2015.08.0

Helium/Hydrogen Separation using Rt-Msieve 5A. Restek Pure Chromatography. Recuperado de: https://www.restek.com/it/pagine/chromatogram-view/GC_MS01136

Hernández I., J. A., & Bonilla, D. (2020). Examining Mexico's energy policy under the 4T. *Extractive Industries and Society*, 7(2), 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.exis.2020.03.002>

Hernández-Medina, M., Torruco-Uco., J. G., Chel-Guerrero, L., Betancur-Ancona, D. (2008). Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(3), 718–726. doi:10.1590/s0101-20612008000300031

Juárez-Arellano, E.A., Urzúa-Valenzuela, M., Peña-Rico, M.A., Aparicio-Saguila, A., Valera-Zaragoza, M., Huerta-Heredia, A.A., Navarro-Mtz, A.K. (2021). Planetary ball-mill as a versatile tool to controlled potato starch modification to broaden its industrial applications. *Food Research International*. 140, 109870. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109870>

Kizil, R., Irudayaraj, J., Seerharaman, K. (2002). Characterization of Irradiated Starches by Using FT-Raman and FTIR Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3912-3918.

Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., Stroeve, P. (2009). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 48(8), 3713–3729. doi:10.1021/ie801542g

Kumar, V., S., Sajeevkumar A., V., Kumar, S. (2018). The influence of bound water on the FTIR characteristics of starch and starch nanocrystals obtained from selected natural sources. *Starch Stärke*, 1700026. doi:10.1002/star.201700026

Liu D., Wu Q., Chen H., Chang P. (2009). Transitional properties of starch colloid with particle size reduction from micro to nanometer. *Journal of Colloid and Interface Science*. 117-124.

Liu, X., Wang, Y., Yu, L., Tong, Z., Chen, L., Liu, H., Li, X. (2013). Thermal degradation and stability of starch under different processing conditions. *Starch/Stärke*, 65, 48–60. doi:10.1002/star.201200198

Madigan M. T., Martinko J. M., Dunlap P. V., Clark D. P. (2009). *Biología de los microorganismos*. Pearson educación, S.A., 12ª Edición.

Martínez-López, V. (2018). Modificación de sustratos orgánicos por molienda mecánica para la obtención de biomasa de una cepa productora de biohidrógeno. Tesis de Maestría. Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, Oaxaca, México.

Miller L, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. doi: <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

Morales-Toledo, L. I. (2018). Efecto de la molienda mecánica en las propiedades fisicoquímicas de fuentes de carbono con posible uso en producción de hidrógeno por fermentación. Tesis de Maestría. Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, Oaxaca, México.

Navarro-Mtz, A.K., Martínez-García, R., Urzua-Valenzuela, M., Roldan-Sabino, C., Kakazey M., Juárez-Arellano, E.A. (2019). High-energy ball milling treatment of soybean for *Bacillus thuringiensis* culture media. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 128(3), 296-301. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.02.010>

Navarro-Mtz, A.K., Urzua-Valenzuela, M., Morelos-Pedro, M.A., Roldan-Sabino, C., Quintana-Melgoza, J.M., Kakazey M., Juárez-Arellano, E.A. (2017). Hydrogen Production from Non-Conventional Biomass Pyrolysis. *Inorganic Chemistry An Indian Journal*, 12(1):107.

Piğłowska, M., Kurc, B, Rymaniak, L., Lijewski, P., Fuć. (2020). Kinetics and thermodynamics of thermal degradation of different starches and estimation the OH group and H₂O Content on the surface by TG/DTG-DTA. *Polymers*, 12, 357. doi:10.3390/polym12020357

Poladyan, A., Margaryan, L., Trchounian, K., Trchounian, A. (2020). Biomass and biohydrogen production during dark fermentation of *Escherichia coli* using office paper waste and cardboard. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(1), 286–293. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.10.246>

Pozo, C., Rodríguez-Llamazares, S., Bouza, R., Barral, L., Castaño, J., Muller, N., Restrepo, I. (2018). Study of the structural order of native starch granules using combined FTIR and XRD analysis. *Journal of Polymer Research*, 25, 266. <https://doi.org/10.1007/s10965-018-1651-y>

Pritchard, M. K., & Adam, L. R. (1994). Relationships between fry color and sugar concentration in stored russet burbank and shepody potatoes. *American Potato Journal*, 71(1), 59–68.

Qu, X., Zeng, H., Gao, Y., Mo, T., Li, Y. (2022). Bio-hydrogen production by dark anaerobic fermentation of organic wastewater. *Frontiers in Chemistry*, 10:978907. doi: 10.3389/fchem.2022.978907

Redwood D., M. & Macaskie E., L. (2006). A two-stage, two-organism process for biohydrogen from glucose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 1514-1521. doi: 10.1016/j.ijhydene.2006.06.018

Ríos R., K.L. (2014). Análisis comparativo de las propiedades físico-químicas y nutrimentales de almidón obtenido a partir de dos especies de malanga (*colocasia antiquorum* y *colocasia esculenta*) cultivadas en el estado de Oaxaca. Tesis Profesional. Universidad Tecnológica de la Mixteca, Huajuapán de León, Oaxaca.

Romero-Hernandez, H.A., Sánchez-Rivera, M.M., Alvarez-Ramirez, J., Yee-Madeira, H., Yañez-Fernandez, J., Bello-Pérez, L.A. (2021). Avocado oil encapsulation with OSA-esterified taro starch as wall material: Physicochemical and morphology characteristics. *LWT-Food Science and Technology*, 138, 110629. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110629>

Rosales-Colunga, L.M & De León Rodríguez, A. (2014). *Escherichia coli* and its application to biohydrogen production. *Environmental Science and Bio/Technology*, 14(1), 1-13 doi: 10.1007/s11157-014-9354-2

Sánchez-Rivera, J. (2020). Efecto de la modificación dual mediante molienda de bolas y entrecruzamiento sobre las propiedades del almidón de malanga (*Colocasia esculenta* L.). Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz.

Sant'Ana da Silva, A., Inoue, H., Endo, T., Yano, S., Bon, E.P.S. (2010). Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresource Technology*, 101, 7402–7409. doi: 10.1016/j.biortech.2010.05.00

Şen, D., & Gökmen, V. (2022). Kinetic modeling of Maillard and caramelization reactions in sucrose-rich and low moisture foods applied for roasted nuts and seeds. *Food chemistry*, 395, 133583. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133583>

Show, K.Y., Lee, D.J., Chang, J.S. (2011). Bioreactor and process desing for biohydrogen production. *Bioresource Technology*, 102, 8524-8533. doi: 10.1016/j.biortech.2011.04.055

Sinha, P. & Pandey, A. (2011). An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 7460-7478. doi: 10.1016/j.ijhydene.2011.03.077

Sopicka-Lizer, M. (2010). Introduction to mechanochemical processing. *High-Energy Ball Milling*, 1–5. doi: 10.1533/9781845699444.1

Sosa-Arróniz, A. (2020). Efecto de agentes estabilizadores de mecanoradicales de almidón de papa producidos durante la molienda mecánica de alta energía. Tesis Profesional. Universidad Tecnológica Emiliano Zapata del Estado de Morelos.

Stanbury, P.F., Whitaker, A., Hall, S.J. (2017). Principles of fermentation technology. Butterworth-Heinemann, Elsevier, 3rd Ed.

- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1–11. doi:10.1016/s0960-8524(01)00212-7
- Suryanarayana, C. (2001). Mechanical Alloying and Milling. *Process in Materials Science*, 46, 1-184. doi: [https://doi.org/10.1016/S0079-6425\(99\)00010-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6425(99)00010-9)
- Swinehart D., F. (1962). The Beer-Lambert Law. *Journal of Chemical Education*, 39(7), 333-335. doi: <https://doi.org/10.1021/ed039p333>
- Tirado-Gallegos, J. M., Zamudio-Flores, P.B., Ríos-Velasco, C., Acosta-Muñiz, C. H., Gutiérrez-Meraz, F., Islas-Hernández, J.J., Salgado-Delgado, R. (2016) Effect of the method of isolation and the degree of ripeness on the physicochemical, structural and rheological properties of apple starch. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15, 391-403.
- Toonen, A. (2013). Hydrogen Detection with a TCD using Mixed Carrier Gas on the Agilent Micro GC. *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-3199EN.
- Urzua-Valenzuela, M. (2017). Transformación mecánica de alta energía de sustratos orgánicos con posible uso en medios de cultivo. Tesis Profesional. Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, Oaxaca, México.
- Urzua-Valenzuela, M. (2018). Estudio del efecto de la molienda mecánica de alta energía sobre las propiedades del almidón de papa y maíz. Tesis de Maestría. Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, Oaxaca, México.
- Vardar-Schara, G., Maeda, T., Wood K., T. (2008). Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation. *Microbial Biotechnology*, 1, 107–125. doi: 10.1111/j.1751-7915.2007.00009.x
- Wang, J. K. (1932). Taro, a review of Colocasia esculenta and its potentials. *Honolulu: University of Hawaii Press*. <http://hdl.handle.net/10125/23024>
- Wang, J., Wan, W. (2009). Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 799–811. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.11.015
- Weijun, Y. (2015). Analytical accuracy of hydrogen measurement using gas chromatography with thermal conductivity detection. *Journal of Separation Science*, 38(15), 2640–2646. <https://doi.org/10.1002/jssc.201500230>
- Yu, J., Paterson, N., Blamey, J., Millan, M. (2017). Cellulose, xylan and lignin interactions during pyrolysis of lignocellulosic biomass. *Fuel*, 191,140–149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2016.11.057>
- Zohuri, B., Mossavar-Rahmani, F., Moghaddam, M. (2022). Renewable and nonrenewable energy flow resiliency for day-to-day production and consumption. *Journal of Energy and Power Engineering*, 16, 13-18. doi: 10.17265/1934-8975/2022.01.003